



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ

Μεταπτυχιακή Διατριβή

**“Το Προσαρμοστικό Τοπίο Της Τεχνητής
Επιλογής:
Μιτοχονδριακή Βιοενεργητική & Heat Stress”**

**“The Adaptive Scenery of Artificial Selection:
Mitochondrial Bioenergy & Heat Stress”**



Κωνσταντίνα Καρατζά

Λάρισα, 2019

Τριμελής επιτροπή

Επιβλέπων καθηγητής

ΖΗΣΗΣ ΜΑΜΟΥΡΗΣ

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών - Τμήμα Βιοχημείας
& Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας - Πρύτανης Π.Θ.

Μέλος

ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ ΜΟΥΤΟΥ

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών - Τμήμα
Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μέλος

ΜΠΙΛΛΙΝΗΣ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ

Καθηγητής Ιολογίας και Λοιμωδών Νοσημάτων - Κτηνιατρική
Σχολή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Ζ. Μαμούρη, επιβλέποντα καθηγητή, για την εμπιστοσύνη και τη δυνατότητα που μου έδωσε να συμμετέχω στην παρούσα μελέτη, όπως επίσης την κυρία Α. Μούτου για τη συμβολή της στην εκπόνηση της παρούσας εργασίας, καθώς και το τρίτο μέλος της τριμελούς επιτροπής τον κύριο Χ. Μπιλλίνη για τη συμμετοχή του σε αυτή.

Θα ήθελα, επιπλέον, να ευχαριστήσω τον κύριο Κ. Σταμάτη, μέλος του εργαστηριακού διδακτικού προσωπικού, και το διδάκτορα Θ. Γιαννούλη για τις χρήσιμες συμβουλές, την καθοδήγηση και τη βοήθεια κατά τη διάρκεια πραγματοποίησης της παρούσας εργασίας, αλλά και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για τη φιλική διάθεση και το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας.

Ξεχωριστά θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, που μου δίνει τη δυνατότητα να σπουδάζω, καθώς και το φιλικό περιβάλλον για την ψυχολογική υποστήριξη.

Περίληψη

Η παγκόσμια κλιματική αλλαγή, η οποία χαρακτηρίζεται από μία συνεχώς αυξανόμενη περιβαλλοντική θερμοκρασία, επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τα παραγωγικά ζώα, δυσχεραίνοντας τις συνθήκες διαβίωσής τους και περιορίζοντας το παραγωγικό τους προφίλ. Η θερμική καταπόνηση που υφίστανται τα ζώα, και πιο συγκεκριμένα οι αγελάδες γαλακτοπαραγωγής που αποτελούν το ζωϊκό μοντέλο της παρούσας μελέτης, εκδηλώνεται κατά βάση με μειωμένη παραγωγή γάλακτος και υπογονιμότητα, γεγονός που επιφέρει σημαντικές οικονομικές απώλειες στον τομέα της κτηνοτροφίας. Επομένως, κρίνεται αναγκαία η έρευνα εκείνων των ατόμων μέσα στο σύνολο του πληθυσμού που φέρουν γενετικά στοιχεία τα οποία τους προσδίδουν θερμική ανοχή, με τελικό στόχο τη γενετική βελτίωση των αγελάδων μέσω στοχευμένων διασταυρώσεων των πλεονεκτικών ατόμων. Για το σκοπό αυτό, και με δεδομένο το ρόλο των μιτοχονδρίων στην παραγωγή ενέργειας και τη θερμογένεση, μελετήθηκε η ύπαρξη σημειακών πολυμορφισμών (SNPs) στο μιτοχονδριακό γονίδιο που κωδικοποιεί την υπομονάδα I του συμπλόκου IV της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (γονίδιο COI), καθώς έχει βρεθεί συμμετοχή του συμπλόκου αυτού στη διαδικασία της θερμορύθμισης στους οργανισμούς με την υπομονάδα I να κατέχει κύριο ρόλο στην καταλυτική δράση του συμπλόκου. Οι τεχνικές που εφαρμόστηκαν στην παρούσα εργασία περιλαμβάνουν την απομόνωση γενετικού υλικού από δείγματα αίματος των αγελάδων, την ενίσχυση του γονιδίου COI με την εφαρμογή της μεθόδου PCR, την επιλογή προτύπων αλληλουχιών με τη μέθοδο SSCP και τέλος την αλληλούχιση των ενισχυμένων ακολουθιών και την επεξεργασία τους με βιοπληροφορικά προγράμματα. Από τα αποτελέσματα που λήφθηκαν, δεν έγινε εντοπισμός κάποιας σημειακής μετάλλαξης στο τμήμα του γονιδίου COI που μελετήθηκε, η οποία να αλλάζει το γονιδιακό προϊόν και να μπορεί να συσχετιστεί με θερμοαντοχή. Ωστόσο, η μελέτη αυτή αποτελεί το πρώτο βήμα για τη διερεύνηση μεγαλύτερου τμήματος του γονιδίου COI, όπως και άλλων μιτοχονδριακών γονιδίων, σε μεγαλύτερο αριθμό ατόμων και διαφορετικούς πληθυσμούς αγελάδων, που ενδεχομένως να παρουσιάζουν μεγαλύτερη γενετική ποικιλομορφία.

Abstract

Global climate change, which is characterized by a constantly increasing environmental temperature, greatly affects productive animals, making their living conditions difficult and limiting their productive profile. The thermal stress on animals, and in particular the dairy cows constituting the animal model of the present study, is mainly manifested by reduced milk production and infertility, which results in considerable economic losses in the livestock sector. It is therefore necessary to expel those individuals within the population who carry genetic elements which give them thermal tolerance, with the ultimate aim of genetically improving cows through targeted crossings of beneficial individuals. For this purpose, and given the role of mitochondria in energy production and thermogenesis, the presence of point polymorphisms (SNPs) has been studied in the mitochondrial gene encoding subunit I of the oxidative phosphorylation complex IV (*coi* gene), since this complex is implemented in the thermoregulation process in organisms, and subunit I plays a key role in the catalytic activity of the complex. The techniques applied in the present study include the isolation of genetic material from cow blood samples, the amplification of the *coi* gene by applying the PCR method, the selection of standard sequences by the SSCP method, and finally the sequencing of the amplified sequences and their processing with bioinformatics programs. From the results obtained, no point mutation was detected in the part of the studied *coi* gene that alters the gene product and can be associated with heat resistance. However, this study is the first step in investigating a larger segment of the *coi* gene, as well as other mitochondrial genes, to a larger number of individuals and different cow populations that may harbor genetic diversity.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1. <i>Bos taurus</i> - Γενικά χαρακτηριστικά.....	9
1.1.1. Συστηματική κατάταξη της αγελάδας.....	10
1.2. Θερμικό στρες σε ζώα κτηνοτροφίας.....	10
1.3. Θερμικά ουδέτερη ζώνη.....	11
1.4. Προσαρμογές των ζώων απέναντι στο θερμικό στρες.....	12
1.5. Επιδράσεις του θερμικού στρες στα γαλακτοπαραγωγικά ζώα.....	13
1.5.1. Επιδράσεις στην υγεία.....	13
➤ Πρόσληψη τροφής και διαταραχές στη φυσιολογία των ζώων.....	13
➤ Πρόσληψη νερού.....	14
➤ Οξεοβασική ισορροπία.....	15
➤ Οξειδωτικό στρες.....	15
➤ Ανοσοποιητικό σύστημα.....	15
1.5.2. Επιδράσεις στην παραγωγή και σύνθεση γάλακτος.....	17
1.5.3. Επιδράσεις στην αναπαραγωγική απόδοση.....	18
➤ Επιδράσεις στην αναπαραγωγική απόδοση των θηλυκών ατόμων.....	18
➤ Επιδράσεις στην αναπαραγωγική απόδοση των αρσενικών ατόμων.....	19
1.6. Στρατηγικές για τη βελτίωση του θερμικού στρες.....	20
1.6.1 Φυσικές τροποποιήσεις του περιβάλλοντος.....	20
1.6.2 Διατροφική διαχείριση.....	21
1.6.3 Γονίδια που σχετίζονται με το θερμικό στρες και γενετική επιλογή...22	
1.7. Προσαρμογή mtDNA σε θερμοκρασιακά περιβάλλοντα.....	25
1.7.1. Το σύμπλοκο IV.....	27
1.7.2. Το γονίδιο COI.....	28
1.8. ΣΚΟΠΟΣ.....	29
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	30
2.1. Δείγματα.....	30
2.2. Απομόνωση DNA.....	30
2.3. PCR-Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για το γονίδιο COI.....	30
2.4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης.....	33

2.5. Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (SSCP): Single-strand conformation polymorphism.....	33
2.6. Καθαρισμός προϊόντων PCR.....	35
2.7. Αλληλούχηση των προϊόντων PCR και ανάλυση των δεδομένων.....	36
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	37
3.1. Απομόνωση DNA.....	37
3.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	38
3.3. SSCP- Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας.....	38
3.4. Αλληλούχηση.....	40
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	43
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	47

Κατάλογος Εικόνων:

Εικόνα 1: Δομή του συμπλόκου IV της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (πηγή: τροποποιημένη εικόνα από το διαδίκτυο).....	28
Εικόνα 2: Εντοπισμός του γονιδίου COI στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα του είδους <i>B. taurus</i> (πηγή: ncbi/gene για το γονίδιο COI).....	28
Εικόνα 3: Ενδεικτική εικόνα πηκτής αγαρόζης μετά από ηλεκτροφόρηση απομονωμένου DNA - παρατήρηση στο UV. Οι αριθμοί στο πάνω μέρος της εικόνας αντιστοιχούν στους κωδικούς των δειγμάτων/αγελάδων.....	37
Εικόνα 4: Ενδεικτική εικόνα πηκτής αγαρόζης μετά από ηλεκτροφόρηση ενισχυμένου DNA με PCR- παρατήρηση στο UV. Οι αριθμοί στο πάνω μέρος της εικόνας αντιστοιχούν στους κωδικούς των δειγμάτων/αγελάδων, το L στον μάρτυρα μοριακού μεγέθους και το N στον αρνητικό μάρτυρα.....	38
Εικόνα 5: Ενδεικτική εικόνα πηκτής πολυακρυλαμίδης που προέκυψε από την τεχνική SSCP. Με λευκά βέλη σημειώνονται τα δείγματα που εμφάνισαν διαφορετικά πρότυπα ζωνώσεων.....	39
Εικόνα 6: Ενδεικτική εικόνα χρωματογραφήματος από τμήμα αλληλουχίας όπως προέκυψε από την αλληλούχηση του γονιδίου COI με τον εκκινητή forward.....	40
Εικόνα 7: Απεικόνιση των τριών διαφορετικών προτύπων αλληλουχιών. Με κύκλο επισημαίνονται οι θέσεις εντοπισμού των πολυμορφισμών.....	41
Εικόνα 8: Πρότυπη αλληλουχία του γονιδίου COI του είδους <i>B. taurus</i> , από τη βάση δεδομένων του NCBI.....	42

Κατάλογος Πινάκων:

Πίνακας 1: Συστηματική κατάξη της αγελάδας.....	10
Πίνακας 2: Ετικέτα και αλληλουχία των εκκινητών.....	31
Πίνακας 3: Σύσταση διαλύματος για την PCR.....	32
Πίνακας 4: Συστατικά και ποσότητες για την παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδης.....	34

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. *Bos taurus* – Γενικά χαρακτηριστικά

Η επιστημονική ονομασία *Bos taurus*, έχει δοθεί στο σύνολο των εκτρεφόμενων οικόσιτων βοοειδών. Το είδος *B. taurus* αποτελείται από μεγαλόσωμα μηρυκαστικά θηλαστικά, με το ύψος τους να κυμαίνεται από 120 έως 150 εκατοστά και το βάρος τους κατά μέσο όρο να προσεγγίζει τα 750 κιλά. Τα χαρακτηριστικά αυτά εξαρτώνται από τη φυλή και το άτομο. Η διάρκεια ζωής τους είναι 18 με 22 έτη και το διάστημα της κύησης διαρκεί περίπου 9 μήνες. Το είδος αυτό διακρίνεται σε δύο κύρια υποείδη, τα βοοειδή *Bos taurus* (ή *Bos taurus taurus*) και τα βοοειδή *Bos indicus* (ή *Bos taurus indicus*), που συνήθως αναφέρονται και ως zebu. Τα μέχρι τώρα δεδομένα υποστηρίζουν πως τα ζώα αυτά εμφανίστηκαν αρχικά στην Ασία και έπειτα η εκτροφή τους αναπτύχθηκε σταδιακά σε ολόκληρο τον πλανήτη, όπου προσαρμόστηκαν ανάλογα με τις εκάστοτε συνθήκες του κάθε τόπου. Παγκοσμίως έχουν αναγνωριστεί περισσότερες από χίλιες φυλές και πλέον κατόπιν ανθρώπινης παρέμβασης (επιλογή, διατροφή, διασταύρωση) έχουν προκύψει αγελάδες με βελτιωμένα χαρακτηριστικά. Οι βελτιωμένες αγελάδες έχουν μεγαλύτερο σωματικό μέγεθος, είναι αναπαραγωγικά ώριμες σε μικρότερη ηλικία, παράγουν μεγαλύτερες ποσότητες γάλακτος και καταναλώνουν περισσότερη τροφή. Η εκτροφή της αγελάδας έχει προσφέρει μεγάλο οικονομικό όφελος στον άνθρωπο, καθώς τα ζώα αυτά χρησιμοποιούνται ευρέως για την παραγωγή κρέατος, γάλακτος και μιας πληθώρας γαλακτοκομικών προϊόντων (Wilson & Reeder, 2005). Το 2009, τα βοοειδή έγιναν ένα από τα πρώτα κτηνοτροφικά ζώα που διέθεταν ένα πλήρως χαρτογραφημένο γονιδίωμα.

Οι αγελάδες, και ιδίως οι βελτιωμένες, πολύ συχνά προσβάλλονται από ασθένειες γεγονός που συνεπάγεται μεγάλες οικονομικές απώλειες, αλλά και κινδύνους για τη δημόσια υγεία. Μία από τις σοβαρότερες διαταραχές που μπορούν να εμφανίσουν οι αγελάδες είναι η σπογγώδης εγκεφαλοπάθεια, η οποία αναφέρεται και ως «νόσος των τρελών αγελάδων». Η νόσος αυτή μέσω της τροφικής αλυσίδας μπορεί να μεταδοθεί και στον άνθρωπο. Άλλες ασθένειες που μπορούν να εμφανιστούν στα βοοειδή είναι αυτές του καταρροϊκού πυρετού και της σήψης του ποδιού.

1.1.1. Συστηματική κατάταξη της αγελάδας

Στον παρακάτω πίνακα παρατίθεται η επιστημονική ταξινόμηση της αγελάδας (πίνακας 1)

Πίνακας 1: Συστηματική κατάταξη της αγελάδας

Βασίλειο	Ζώα (<i>Animalia</i>)
Συνομοταξία (Φύλο)	Χορδωτά (<i>Chordata</i>)
Ομοταξία (Κλάση)	Θηλαστικά (<i>Mammalia</i>)
Τάξη	Αρτιοδάκτυλα (<i>Artiodactyla</i>)
Οικογένεια	Βοοειδή (<i>Bovidae</i>)
Υποοικογένεια	Βοοίνες (<i>Bovinae</i>)
Γένος	Βους (<i>Bos</i>)
Είδος	<i>B. taurus</i>

1.2. Θερμικό στρες σε ζώα κτηνοτροφίας

Η βιωσιμότητα στο σύστημα ζωϊκής παραγωγής επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από την αλλαγή του κλίματος. Μια ανισορροπία μεταξύ της παραγωγής μεταβολικής θερμότητας μέσα στο σώμα του ζώου και της διασποράς της στο περιβάλλον προκαλεί θερμική καταπόνηση (heat stress/HS) υπό υψηλή θερμοκρασία αέρα και σχετική υγρασία. Η κυριότερη αντίδραση των ζώων σε περιβάλλον με υψηλή θερμοκρασία είναι η αύξηση του ρυθμού της αναπνοής, της θερμοκρασίας του ορθού και του καρδιακού ρυθμού. Αυτό επηρεάζει άμεσα την πρόσληψη τροφής, μειώνει τον ρυθμό ανάπτυξης, την απόδοση γάλακτος, τις αναπαραγωγικές επιδόσεις, ακόμη και πρόκληση θανάτου σε ακραίες περιπτώσεις. Οι γαλακτοπαραγωγικές φυλές είναι κατά κανόνα περισσότερο ευαίσθητες στο θερμικό στρες από τις φυλές κρέατος και τα ζώα με υψηλότερη παραγωγή είναι επιπροσθέτως ευαίσθητα δεδομένου ότι παράγουν περισσότερη μεταβολική θερμότητα. Το θερμικό στρες καταστέλλει το ανοσοποιητικό και ενδοκρινικό σύστημα ενισχύοντας έτσι την ευαισθησία ενός ζώου σε διάφορες ασθένειες. Ως εκ τούτου, η βιώσιμη παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων παραμένει μια τεράστια πρόκληση σε αυτές τις μεταβαλλόμενες κλιματολογικές συνθήκες παγκοσμίως (Das et al., 2016).

Το στρες είναι μια αντανάκλαστική αντίδραση των ζώων σε σκληρά περιβάλλοντα και προκαλεί δυσμενείς συνέπειες που κυμαίνονται από δυσφορία μέχρι και θάνατο. Η αλλαγή του κλίματος αποτελεί μία από τις σημαντικότερες απειλές για την επιβίωση

των διαφόρων ειδών, των οικοσυστημάτων και της βιωσιμότητας των συστημάτων ζωϊκής παραγωγής σε ολόκληρο τον κόσμο, ιδίως στις τροπικές και εύκρατες χώρες. Η διακυβερνητική επιτροπή για την κλιματική αλλαγή ανέφερε ότι η θερμοκρασία της γης έχει αυξηθεί κατά 0,2 °C ανά δεκαετία και επίσης προέβλεψε ότι η μέση παγκόσμια θερμοκρασία επιφάνειας θα αυξηθεί σε 1,4-5,8 °C έως το 2100. Αναφέρθηκε επίσης ότι κυρίως οι αναπτυσσόμενες χώρες τείνουν να είναι πιο ευάλωτες σε ακραία καιρικά φαινόμενα, καθώς εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από ευαίσθητους στο κλίμα τομείς, όπως η γεωργία και η δασοκομία (IPCC, 2007). Πρόσφατες προβλέψεις τονίζουν τη σοβαρότητα του προβλήματος της θερμικής καταπόνησης ως αυξανόμενο πρόβλημα στο εγγύς μέλλον εξαιτίας της εξέλιξης της υπερθέρμανσης του πλανήτη. Έτσι, οι κλιματικές αλλαγές ενδέχεται να επηρεάσουν την οικονομική βιωσιμότητα των συστημάτων κτηνοτροφίας παγκοσμίως (Silanikove & Koluman, 2015). Η έρευνα στον τομέα των γαλακτοπαραγωγικών βοοειδών τείνει να επικεντρώνεται στις γενετικές βελτιώσεις για την αύξηση της παραγωγής γάλακτος και την παροχή θρεπτικών ουσιών στην αγελάδα κατά την πρώιμη γαλουχία (Kadzere et al., 2002).

1.3. Θερμικά ουδέτερη ζώνη

Κάθε είδος, φυλή ή κατηγορία ζώων, σε σχέση με τη φυσιολογική του κατάσταση, έχει μια ζώνη άνεσης, στην οποία η ενεργειακή δαπάνη είναι ελάχιστη, σταθερή και ανεξάρτητη της θερμοκρασίας περιβάλλοντος (Nardone et al., 2006). Η ζώνη αυτή χαρακτηρίζεται ως θερμικά ουδέτερη ζώνη (thermoneutral zone/TNZ) και κυμαίνεται από 16°C έως 25°C, εντός της οποίας τα ζώα διατηρούν μια φυσιολογική θερμοκρασία σώματος 38.4-39.1°C. Γενικά, το εύρος της TNZ (από την χαμηλότερη κρίσιμη θερμοκρασία έως την ανώτερη) εξαρτάται από την ηλικία, το είδος, τη φυλή, τη διατροφή, την προηγούμενη κατάσταση εγκλιματισμού, τη μόνωση των ιστών (λίπος, δέρμα), την εξωτερική μόνωση (τρίχωμα) και τη συμπεριφορά ενός ζώου (Yousef, 1985). Ένας ακόμα δείκτης που συχνά χρησιμοποιείται για να περιγράψει το στρες που δέχονται τα ζώα λόγω των κλιματικών συνθηκών, είναι ο δείκτης θερμοκρασίας-υγρασίας (temperature humidity index), THI. Μία τιμή THI 72 και λιγότερο θεωρείται ως θερμικό στρες, σε τιμές μεταξύ 73-77 το θερμικό στρες θεωρείται ήπιο, σε τιμές μεταξύ 78-89 το στρες θεωρείται μέτριο και σε τιμές μεγαλύτερες από 90 η θερμική καταπόνηση θεωρείται σοβαρή (Srikandakumar & Johnson, 2004). Περιβαλλοντικές θερμοκρασίες πάνω από 20-25°C σε εύκρατο κλίμα και 25-37°C σε τροπικό κλίμα όπως στην Ινδία, ενισχύουν την αύξηση της θερμοκρασίας στο σώμα και προκαλούν θερμικό στρες στα ζώα (Vale, 2007, Sunil Kumar et al., 2011). Ως αποτέλεσμα η θερμοκρασία της επιφάνειας του σώματος, ο ρυθμός αναπνοής (respiration rate/RR), ο καρδιακός ρυθμός (heart rate/HR) και η θερμοκρασία του ορθού (rectal temperature/RT) αυξάνονται, γεγονός που με τη σειρά του επηρεάζει την πρόσληψη τροφής, την παραγωγική και την αναπαραγωγική αποτελεσματικότητα των

ζώων. Με άλλα λόγια, το ζώο στην προσπάθειά του να διατηρήσει τη φυσιολογική του θερμοκρασία δαπανά περισσότερη ενέργεια για τη θερμορύθμιση, και έτσι η διαθέσιμη ενέργεια για τις παραγωγικές διαδικασίες είναι λιγότερη (Sejan, 2013). Σε τιμές $RT > 39,0^{\circ}\text{C}$ και $RR > 60/\text{min}$ οι αγελάδες υποβλήθηκαν σε θερμικό στρες επαρκές για να επηρεάσει την απόδοση γάλακτος και τη γονιμότητα (Kadokawa, 2012). Ωστόσο, τα ζώα που είναι ομοιόθερμα μπορούν να αντισταθούν στο θερμικό στρες σε κάποιο βαθμό ανάλογα με το είδος, τη φυλή και την παραγωγικότητα (Berman, 2005, Collier, 2008). Μεταξύ των γαλακτοπαραγωγών ζώων, οι αίγες είναι το πιο προσαρμοσμένο είδος που υποβάλλεται σε θερμικό στρες όσον αφορά την παραγωγή, αναπαραγωγή και επίσης την αντοχή στις ασθένειες. Επιπλέον, η ευαισθησία των βοοειδών γαλακτοπαραγωγής στη θερμική καταπόνηση αυξάνεται με την αύξηση της γαλακτοπαραγωγής. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στην αύξηση της μεταβολικής θερμικής παραγωγής ως αποτέλεσμα της αύξησης των επιπέδων παραγωγής στα γαλακτοκομικά ζώα (Das et al., 2016).

1.4. Προσαρμογές των ζώων απέναντι στο θερμικό στρες

Η ικανότητα ρύθμισης της θερμοκρασίας είναι μια εξελικτική προσαρμογή που επιτρέπει στα ομοιόθερμα να λειτουργούν παρά τη διακύμανση της θερμοκρασίας περιβάλλοντος (Bitman et al., 1984). Αυτή η ικανότητα επιτρέπει επίσης τη χρήση της θερμοκρασίας ως σήμα για τον έλεγχο των φυσιολογικών διεργασιών. Το γεγονός ότι οι υψηλότερες παραγωγές γάλακτος έχουν επιτευχθεί σε εύκρατα κλίματα και ότι οι αγελάδες με υψηλό γενετικό δυναμικό που μεταφέρονται σε τροπικά περιβάλλοντα δεν κατάφεραν να διατηρήσουν παραγωγική τους ικανότητα υπογραμμίζει την αλληλεπίδραση του ζώου και του περιβάλλοντος (Kadzere et al., 2002). Οι διακυμάνσεις στις φυσιολογικές αποκρίσεις, δηλαδή ο ρυθμός αναπνοής, ο ρυθμός παλμών, η θερμοκρασία του ορθού και ο ρυθμός εφίδρωσης ποικίλλουν ανάλογα με τις θερμοκρασιακές εποχικές αλλαγές σε μια προσπάθεια να διατηρηθεί η κανονική θερμοκρασία του σώματος του ζώου ανεξάρτητα από τη διακύμανση της θερμοκρασίας περιβάλλοντος. Ως εκ τούτου, αυτοί θεωρούνται σημαντικοί δείκτες συγκριτικής προσαρμοστικότητας διαφορετικών γονότυπων. Η αυξημένη αναπνοή, παραδείγματος χάριν, είναι η πρώτη αντίδραση όταν τα ζώα εκτίθενται σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος πάνω από τη θερμοευαίσθητη ζώνη (Maurya et al., 2007). Οι μηχανισμοί φαινοτυπικής, φυσιολογικής και βιοχημικής προσαρμογής εξηγούνται στο Yousef (1985).

Ο Mullick (1960) βρήκε ότι τα βουβάλια προσαρμόζονται καλύτερα στις ζεστές τροπικές περιοχές από ό,τι τα βοοειδή λόγω της αντοχής τους στη θερμότητα και της ανθεκτικότητας σε ορισμένες ασθένειες και παράσιτα. Επίσης, σε ένα είδος, διαφορετικές φυλές παρουσιάζουν διαφορετικά επίπεδα προσαρμογής στο θερμικό

στρες. Είναι επίσης γενικά αποδεκτό ότι τα βοοειδή τύπου *Bos taurus* είναι λιγότερο προσαρμοσμένα σε τροπικά και υποτροπικά θερμά και κατά καιρούς υγρά περιβάλλοντα, συγκριτικά με τα βοοειδή *B. indicus* και τύπου Zebu. Ο Yousef (1985) αποδίδει την προσαρμοστικότητα των τροπικών βοοειδών έναντι στη θερμότητα, μεταξύ άλλων παραγόντων, στη χαμηλή πρόσληψη τροφής και στους μεταβολικούς ρυθμούς. Επιπλέον, η απώλεια θερμότητας αυξάνεται από μια μεγαλύτερη επιφάνεια, ιδιαίτερα στην περίπτωση ύπαρξης μεγαλύτερου αριθμού υδρωτοποιών αδένων, κοντού τριχώματος και ενδομυϊκής κατανομής λίπους όπως στην περίπτωση των βοοειδών Zebu. Αυτές οι προσαρμογές βοηθούν την αγωγιμότητα της θερμότητας από τον πυρήνα του σώματος προς και από το δέρμα (Ledger, 1959). Συγκρίνοντας τα βοοειδή *B. taurus*, οι Sharma et al. (1983) ανέφεραν ότι τα Jerseys ήταν πιο ανθεκτικά στις επιδράσεις θερμικού στρες στην παραγωγή γάλακτος από ό,τι οι Holstein.

Επειδή τα ζώα μπορούν να προσαρμοστούν στις θερμές περιβαλλοντικές συνθήκες με βαθμιαίο εγκλιματισμό, φαίνεται λογικό να υποθέσουμε ότι οι γαλακτοπαραγωγικές αγελάδες υψηλής παραγωγής εγκλιματίζονται σταδιακά κατά τη διάρκεια των καλοκαιρινών μηνών. Ωστόσο, εάν οι καιρικές μεταβολές είναι ξαφνικές και παρατεταμένες, όπως συμβαίνει συχνά στις μεσογειακές περιοχές και σε ορισμένες περιοχές των Ηνωμένων Πολιτειών, οι αγελάδες είναι λιγότερο πιθανό να εγκλιματιστούν. Σημαντικές μειώσεις στην πρόσληψη τροφής και μείωση στην παραγωγή γάλακτος σηματοδοτούν τέτοιες συνθήκες θερμικής καταπόνησης (Kadzere et al., 2002).

1.5. Επιδράσεις του θερμικού στρες στα γαλακτοπαραγωγικά ζώα

1.5.1. Επιδράσεις στην υγεία

Το θερμικό στρες επιδρά στην υγεία των γαλακτοπαραγωγών ζώων προκαλώντας άμεσες ή έμμεσες επιδράσεις στη φυσιολογία, το μεταβολισμό, τις ορμόνες και το ανοσοποιητικό σύστημα.

➤ Πρόσληψη τροφής και διαταραχές στη φυσιολογία των ζώων

Η αύξηση της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος έχει άμεση αρνητική επίδραση στο κέντρο της όρεξης του υποθαλάμου, μειώνοντας την πρόσληψη τροφής και κατά συνέπεια την παραγωγή γάλακτος (Baile & Forbes, 1974). Αντίθετα, τα μηρυκαστικά

που είναι προσαρμοσμένα σε θερμά περιβάλλοντα είναι σε θέση να διατηρήσουν την όρεξή τους υπό θερμικό στρες (Brosh et al., 1988). Η πρόσληψη τροφής στις γαλακτοπαραγωγικές αγελάδες αρχίζει να μειώνεται σε θερμοκρασίες αέρα 25-26°C και μειώνεται περισσότερο σε θερμοκρασίες άνω των 30°C σε εύκρατες κλιματολογικές συνθήκες, ενώ στους 40°C μπορεί να μειωθεί κατά 40% (Rhoads et al., 2013). Σε αιγοειδή γαλακτοπαραγωγή έχει παρατηρηθεί μείωση στην πρόσληψη τροφής κατά 22-35% (Hamzaoui et al., 2012) και σε βουβάλια κατά 8-10% (Hooda & Singh, 2010). Η μείωση της πρόσληψης τροφής είναι ένας τρόπος για να μειωθεί η παραγωγή θερμότητας στα ζώα σε θερμά περιβάλλοντα, καθώς η αύξηση της θερμοκρασίας του ζώου λόγω της τροφής αποτελεί σημαντική πηγή παραγωγής θερμότητας στα μηρυκαστικά (Kadzere et al., 2002). Ως αποτελέσματα, τα ζώα βιώνουν ένα στάδιο αρνητικού ενεργειακού ισοζυγίου, συνεπώς το σωματικό βάρος μειώνεται (Lacetera, 1996).

Η αύξηση της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος μεταβάλλει τους βασικούς φυσιολογικούς μηχανισμούς του προστομάχου και επηρεάζει αρνητικά τα μηρυκαστικά με αυξημένο κίνδυνο μεταβολικών διαταραχών και προβλημάτων υγείας (Nardone et al., 2010, Soriani et al., 2013). Έχει αναφερθεί ότι στα ζώα υπό συνθήκες θερμικού στρες μειώνεται η παραγωγή οξικού οξέος, ενώ η παραγωγή προπιονικού και βουτυρικού οξέος αυξάνεται καθώς η λειτουργία του προστομάχου μεταβάλλεται (Nonaka et al., 2008). Ως απόκριση αλλάζει ο μικροβιακός πληθυσμός και το pH του προστομάχου από 5,82 σε 6,03 (Hall, 2009), ενώ μειώνεται η κινητικότητα και ο μηρυκασμός. Στη συνέχεια, επηρεάζεται η υγεία με τη μείωση της παραγωγής σάλιου, τη μεταβολή στα πρότυπα πέψης και τη μείωση πρόσληψης ξηράς ουσίας (Nardone et al., 2010, Soriani et al., 2013). Επιπλέον, το θερμικό στρες οδηγεί σε υπολειτουργία του θυρεοειδούς αδένος και επιδρά στα πρότυπα μεταβολισμού του ζώου για τη μείωση της παραγωγής μεταβολικής θερμότητας (Helal et al., 2010).

➤ *Πρόσληψη νερού*

Οι ανάγκες σε νερό και μακροστοιχεία, επηρεασμένες σε μεγάλο βαθμό από τις απαιτήσεις διατήρησης της ομοιόστασης και της ομοιοθερμίας, μεταβάλλονται στις γαλακτοπαραγωγικές αγελάδες κατά τη θερμική καταπόνηση (Beede & Collier, 1985). Το γάλα είναι περίπου 87% νερό και περιέχει μεγάλες συγκεντρώσεις των ηλεκτρολυτών Na, K και Cl. Επομένως, οι θηλάζουσες αγελάδες γαλακτοπαραγωγής έχουν μεγάλη ποσότητα νερού και αυτών των ηλεκτρολυτών (Shalit et al., 1991). Η υψηλής γαλακτοπαραγωγής αγελάδες έχουν αυξημένη πρόσληψη νερού και, σε θερμική καταπόνηση, καταναλώνουν ακόμη περισσότερο νερό που οφείλεται ταχύτερους ρυθμούς αφυδάτωσης (Maltz et al., 1984).

➤ *Οξεοβασική ισορροπία*

Το ζώο υπό συνθήκες θερμικού στρες αυξάνει το ρυθμό της αναπνοής και την εφίδρωση με αποτέλεσμα αυξημένη απώλεια σωματικών υγρών και μεγαλύτερες απαιτήσεις ελέγχου της αφυδάτωσης και της ομοιόστασης του αίματος. Με την αύξηση του ρυθμού αναπνοής, αυξάνεται και η εξάπλωση του CO₂ μέσω των πνευμόνων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αναπνευστική αλκάλωση, καθώς η συγκέντρωση του ανθρακικού οξέος στο αίμα μειώνεται (Benjamin, 1978). Επομένως, το ζώο πρέπει να αντισταθμίσει το pH του αίματος με την έκκριση διττανθρακικού στα ούρα για να διατηρήσει την αναλογία ανθρακικό οξύ: διττανθρακικό στο αίμα (Schneider et al., 1984). Η χρόνια υπερθερμία προκαλεί επίσης σοβαρή ή παρατεταμένη έλλειψη όρεξης, η οποία επιδεινώνει περαιτέρω την αυξημένη παροχή ολικού ανθρακικού οξέος στον προστόμαχο και μειώνει με αυτό τον τρόπο το pH, οδηγώντας σε υποκλινική και οξεία οξείδωση του προστομάχου (Kadzere et al., 2002).

➤ *Οξειδωτικό στρες*

Το οξειδωτικό στρες έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) σε διαφορετικά κύτταρα και ιστούς ζώων υπο συνθήκες θερμικού στρες, που έχουν αρνητικές επιπτώσεις στην φυσιολογία και τον μεταβολισμό του σώματος. Ωστόσο, το σώμα διαθέτει ενζυμικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς (υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), υπεροξειδάση της γλουταθειόνης και καταλάση), μη ενζυμικά μόρια (αλβουμίνη, L-κυστεΐνης, ομοκυστεΐνης και μελατονίνη) και μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά χαμηλού μοριακού βάρους (ασκορβικό οξύ, γλουταθειόνη, ουρικό οξύ, α-τοκοφερόλη, β-καροτένιο, πυροσταφυλικό και ρετινόλη), τα οποία αυξάνονται ως αποτέλεσμα της θερμικής καταπόνησης για την προστασία του οργανισμού από τις αρνητικές επιδράσεις των ROS. Σημαντικά ($p < 0,05$) υψηλότερα επίπεδα των δεικτών οξειδωτικού στρες καταλάση, SOD, αναγωγή της γλουταθειόνης και μαλονδιαλδεΐδη, παρατηρήθηκαν σε θηλάζουσες και μη θηλάζουσες βουβάλες (Lallawmkimi, 2013) και βοοειδή (Yatoo et al., 2014) κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού σε σύγκριση με την εαρινή περίοδο.

➤ *Ανοσοποιητικό σύστημα*

Το ανοσοποιητικό είναι το βασικότερο σύστημα άμυνας του σώματος για την προστασία και την αντιμετώπιση των περιβαλλοντικών πιέσεων. Οι πρωτογενείς δείκτες απόκρισης ανοσίας που περιλαμβάνουν τα λευκά αιμοσφαίρια, τα ερυθρά αιμοσφαίρια, την αιμοσφαιρίνη (Hb) και τη συγκέντρωση γλυκόζης και πρωτεϊνών στο αίμα, αλλάζουν σε συνθήκες θερμικού στρες. Ο αριθμός των λευκοκυττάρων αυξάνεται κατά 21-26% (Abdel-Samee, 1987) και ο αριθμός των ερυθρών αιμοσφαιρίων μειώνεται κατά 12-20% (Habeeb, 1987) σε βοοειδή που έχουν υποστεί θερμικό στρες και αυτό μπορεί να οφείλεται σε καταστροφή των ερυθροκυττάρων. Έχει αναφερθεί εξαιρετικά σημαντική διακύμανση της αιμοσφαιρίνης, της γλυκόζης

του πλάσματος και της ολικής πρωτεΐνης και αλβουμίνης σε προβατίνες malpura όταν εκτίθενται σε διαφορετικές θερμοκρασίες (Sejan et al., 2013). Άλλα ευρήματα, αποκαλύπτουν μειωμένα επίπεδα αιμοσφαιρίνης ως αποτέλεσμα της λύσης των ερυθροκυττάρων, είτε λόγω της αυξημένης προσβολής των μεμβρανών τους από ελεύθερες ρίζες, είτε λόγω της ανεπαρκούς διαθεσιμότητας θρεπτικών συστατικών για τη σύνθεση της αιμοσφαιρίνης, καθώς το ζώο καταναλώνει λιγότερη τροφή εξαιτίας του θερμικού στρες (Srikandakumar & Johnson, 2004). Έχει παρατηρηθεί σημαντική μείωση της γλυκόζης του αίματος σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής υπό συνθήκες θερμικού στρες, εξαιτίας της αυξημένης δραστηριότητας της ινσουλίνης στο αίμα (Rhoads et al., 2009). Επιπλέον, παρατηρήθηκε αύξηση στη συγκέντρωση της κορτιζόλης που οδηγεί σε μειωμένη δραστηριότητα των ουδετερόφιλων στο πλάσμα των ζώων υπό θερμικό στρες, τα οποία αδυνατούν να εισέλθουν στους ιστούς που έχουν προσβληθεί από παθογόνους παράγοντες. Αποτέλεσμα αυτού είναι η δυσμενής κλινική έκβαση της νόσου με πιθανές σοβαρές συνέπειες για την υγεία του ζώου (Kansas, 1996). Η αυξημένη κυκλοφορία της κορτιζόλης προκαλεί επίσης αύξηση των κυτταρικών επιπέδων πρωτεϊνών θερμικού σοκ (HSPs) που λειτουργούν ως σήμα κινδύνου για το ανοσοποιητικό σύστημα ενισχύοντας τη δράση των ουδετερόφιλων και των μακροφάγων ενάντια στους παθογόνους εισβολείς (Do Amaral et al., 2011). Ως εκ τούτου, η τακτική αξιολόγηση των συστατικών του αίματος είναι χρήσιμη για την εκτίμηση της κατάστασης της υγείας των ζώων σε περιοχές με υψηλή θερμοκρασία.

Προβλήματα υγείας όπως η υποκλινική ή κλινική κέτωση, ο υψηλότερος κίνδυνος λιπιδαιμίας του ήπατος και η ηπατική δυσλειτουργία, αναφέρονται επίσης ως απόρροια της θερμικής καταπόνησης των ζώων (Basirico, 2009). Έχει παρατηρηθεί ότι η χωλότητα (πόνος στα πόδια του ζώου) αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος, εφόσον το ζώο στέκεται για περισσότερη ώρα όρθιο και προκαλεί λέπτυνση και πληγές των πελμάτων (Sanders et al., 2009, Privolo & Riva, 2009). Η αλλαγή του κλίματος μπορεί να επιφέρει ουσιαστικές μεταβολές στην κατανομή των ασθενειών και στην εμφάνιση επιδημιών σε πληθυσμούς ζώων που δεν είχαν εκτεθεί στο παρελθόν. Οι φορείς και άλλοι παράγοντες που προκαλούν ασθένειες όπως έντομα και εσωτερικά παράσιτα ευδοκιμούν κάτω από θερμές και υγρές περιβαλλοντικές συνθήκες (Thornton, 2009). Επιπλέον, έχει διαπιστωθεί αυξημένη συχνότητα μαστίτιδας σε γαλακτοφόρες αγελάδες, που μπορεί να οφείλεται σε υψηλές θερμοκρασίες που διευκολύνουν την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό του πληθυσμού μυγών-φορέων παθογόνων που σχετίζονται με τις συνθήκες ζέστης-υγρασίας. Το υπερβολικό θερμικό φορτίο σε ακραίες περιπτώσεις όχι μόνο θέτει σε κίνδυνο την ευημερία των ζώων αλλά μπορεί να οδηγήσει ακόμα και στο θάνατο (Vitali et al., 2009).

1.5.2. Επιδράσεις στην παραγωγή και σύνθεση γάλακτος

Το θερμικό στρες στα γαλακτοπαραγωγικά ζώα επηρεάζει δυσμενώς την παραγωγή γάλακτος και τη σύστασή του, ιδιαίτερα σε ζώα υψηλής γενετικής αξίας (Das et al., 2016). Βέβαια, η ποσοτικοποίηση των άμεσων περιβαλλοντικών επιπτώσεων στην παραγωγή γάλακτος είναι δύσκολη καθώς η παραγωγή γάλακτος επηρεάζεται επίσης έντονα από άλλους παράγοντες, όπως η διατροφική διαχείριση, που μπορεί ή όχι να συνδέεται άμεσα με περιβαλλοντικούς παράγοντες (Fuquay, 1981). Σύμφωνα με τον Bergman (2005) όταν η περιβαλλοντική θερμοκρασία υπερβεί τους 35 °C, ενεργοποιούνται τα συστήματα απόκρισης στο στρες στις θηλάζουσες αγελάδες γαλακτοπαραγωγής. Σε απάντηση, οι αγελάδες γαλακτοπαραγωγής μειώνουν την πρόσληψη τροφής που συνδέεται άμεσα με το αρνητικό ενεργειακό ισοζύγιο, και ευθύνεται σε μεγάλο βαθμό για τη μείωση της σύνθεσης γάλακτος (Wheelock et al., 2010). Επιπλέον, οι απαιτήσεις διατήρησης της ενέργειας αυξήθηκαν κατά 30% στα γαλακτοπαραγωγικά ζώα που υφίστανται θερμικό στρες (NRC, 2007). Ως εκ τούτου, η πρόσληψη ενέργειας δεν θα αρκούσε για να καλύψει τις καθημερινές απαιτήσεις για παραγωγή γάλακτος. Ο West (2003) ανέφερε μία μείωση της πρόσληψης ξηράς τροφής κατά 0,85 kg με κάθε αύξηση θερμοκρασίας αέρα κατά 1 °C πάνω από τη θερμικά ουδέτερη ζώνη της αγελάδας (Rhoads et al., 2009). Σύμφωνα με τους Bouraoui et al. (2002) ημερησίως, ο δείκτης θερμοκρασίας-υγρασίας (THI) συσχετίστηκε αρνητικά με την απόδοση γάλακτος, καθώς αύξηση της τιμής THI από 68 σε 78 μειώνει την πρόσληψη ξηράς τροφής (DMI) κατά 9,6% και την παραγωγή γάλακτος κατά 21%.

Πτώση στην παραγωγή γάλακτος έως και 50% στα γαλακτοπαραγωγικά ζώα μπορεί να οφείλεται σε μειωμένη πρόσληψη τροφής, ή σε μεταβολικές προσαρμογές απέναντι στο θερμικό στρες, καθώς αυτό μεταβάλλει σημαντικά το μεταβολισμό των υδατανθράκων, των λιπιδίων και των πρωτεϊνών (Baumgard & Rhoads, 2013). Έχουν παρατηρηθεί αυξημένα επίπεδα ινσουλίνης και βελτιωμένη ανταπόκριση στην ινσουλίνη σε αγελάδες υπό θερμικό στρες, γεγονός που εξηγεί την αλλαγή στη χρήση της γλυκόζης σε ιστό μη μαστικού αδένος που επηρεάζει τη σύνθεση του γάλακτος (Rhoads et al., 2013). Θερμικό στρες κατά τη διάρκεια της ξηρής περιόδου (δηλ. τους τελευταίους 2 μήνες κύησης) μείωσε τον πολλαπλασιασμό των μαστικών κυττάρων και έτσι μείωσε την απόδοση γάλακτος στην επερχόμενη γαλουχία (Tao & Dahl, 2013). Οι Singh et al. (2013) επίσης ανέφεραν τις αρνητικές επιπτώσεις του θερμικού στρες στη διάρκεια της γαλουχίας, το διάστημα γέννησης, τα συστατικά του γάλακτος και την απόδοση γάλακτος σε βουβάλια Murrah.

Το στάδιο της γαλουχίας είναι ένας σημαντικός παράγοντας για τη σοβαρότητα του θερμικού στρες και τα ζώα τα οποία ήταν στο μέσο της γαλουχίας είναι πιο ευαίσθητα στη θερμότητα σε σύγκριση με τα ζώα που βρίσκονται σε πιο αρχικά ή τελικά στάδια της γαλουχίας. Η μείωση της παραγωγής γάλακτος λόγω του θερμικού στρες ήταν 14% στην πρώιμη γαλουχία και 35% στη μέση γαλουχία (Bernabucci et al., 2010). Ωστόσο, άλλες έρευνες έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι οι κλιματικές συνθήκες φαίνεται

να έχουν μέγιστη επίδραση κατά τη διάρκεια των πρώτων 60 ημερών γαλακτοπαραγωγής (πρώιμη γαλουχία) (Sharma et al., 1983).

Το ζεστό και υγρό περιβάλλον επηρεάζει όχι μόνο την απόδοση του γάλακτος αλλά και την ποιότητά του. Έχει αναφερθεί ότι υπό αυτές τις συνθήκες το ποσοστό των λιπαρών, των μη στερεών λιπαρών (SNF) και των πρωτεϊνών του γάλακτος μειώθηκε κατά 39,7%, 18,9% και 16,9% αντίστοιχα (Kadzere et al., 2002). Οι Bouraoui et al. (2002) παρατήρησαν χαμηλά λιπαρά και πρωτεΐνες στο γάλα κατά τη θερινή περίοδο. Όταν η τιμή THI υπερβαίνει το 72, η περιεκτικότητα του γάλακτος σε λιπαρά και πρωτεΐνες μειώνεται. Επιπλέον, η ανάλυση των πρωτεϊνικών κλασμάτων έδειξε επίσης μείωση των ποσοστών της καζεΐνης, της λακταλβουμίνης, της ανοσοσφαιρίνης G (IgG) και της IgA. Το 80% αυτών συνδέεται με απώλεια παραγωγικότητας και το 20% με προβλήματα υγείας (Nardone et al., 2006). Ωστόσο, παρόλο που το θερμικό στρες μειώνει σημαντικά την παραγωγή γάλακτος, το ποσοστό λίπους και πρωτεϊνών, δεν επηρεάζει την περιεκτικότητα της λακτόζης στο γάλα (Zheng et al., 2009).

1.5.3. Επιδράσεις στην αναπαραγωγική απόδοση

Η υψηλή θερμοκρασία και υγρασία του αέρα επηρεάζουν τις κυτταρικές λειτουργίες με άμεση αλλοίωση και βλάβη διαφόρων ιστών ή οργάνων του αναπαραγωγικού συστήματος και στα δύο φύλα του ζώου (Das et al., 2016).

➤ *Επιδράσεις στην αναπαραγωγική απόδοση των θηλυκών ατόμων*

Το θερμικό στρες μειώνει τη διάρκεια και την ένταση του οίστρου (περίοδος σεξουαλικής δεκτικότητας και γονιμότητας σε πολλά θηλαστικά), στα εκτρεφόμενα ζώα (Singhal et al., 1984). Αυξάνει την έκκριση της ACTH και της κορτιζόλης (Singh et al., 2013) και εμποδίζει τη σεξουαλική συμπεριφορά που προκαλείται από την οιστραδιόλη (Hein & Allrich, 1992). Οι Roth et al. (2000) ανέφεραν ότι τα ωοθυλάκια υφίστανται βλάβη και καθίστανται μη βιώσιμα όταν η θερμοκρασία του σώματος ξεπεράσει τους 40 °C. Η χαμηλή έκκριση οιστραδιόλης καταστέλλει τα σημάδια του οίστρου, συνεπώς και την αύξηση της γοναδοτροπίνης, την ωορρηξία, τη μεταφορά γαμετών και τελικά οδηγεί σε μειωμένη γονιμοποίηση (Wolfenson et al., 2000). Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στη μείωση της γονιμότητας των γαλακτοφόρων ζώων είναι πολυπαραγοντικοί και εξαρτώνται από το μέγεθος του θερμικού στρες. Το θερμικό στρες μειώνει την ανάπτυξη των ωαρίων επηρεάζοντας την ωρίμανσή τους (Singh et al., 2013), ενώ αυξάνει τα επίπεδα προλακτίνης στα ζώα οδηγώντας σε στειρότητα (Alamer, 2011). Επιπλέον, το 80% του οίστρου μπορεί να μην παρατηρηθεί κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού (Rutledge, 2001), γεγονός που μειώνει περαιτέρω τη γονιμότητα. Η θυλακιοτρόπος ορμόνη του πλάσματος (FSH) αυξάνεται κατά τη

διάρκεια του θερμικού στρες οδηγώντας σε μεταβολή της δυναμικής των ωοθυλακίων και καταστολή της λειτουργίας τους που μπορεί να συσχετιστεί με τη χαμηλή γονιμότητα των βοοειδών κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού και του φθινοπώρου (Roth, 2000). Περίπου 20-27% μείωση των επιπέδων σύλληψης καταγράφηκε το καλοκαίρι σε θηλάζουσες αγελάδες γαλακτοπαραγωγής (Chebel et al., 2004, Al-Katanani et al., 1999). Τα ωάρια των αγελάδων που εκτίθενται σε θερμικό στρες χάνουν την ικανότητά τους για γονιμοποίηση και την ανάπτυξη στο στάδιο της βλαστοκύστης (Gendelman et al., 2012a & 2012b).

Η εμβρυϊκή ανάπτυξη και επιβίωση επηρεάζονται επίσης κατά τη θερμική καταπόνηση στα γαλακτοφόρα ζώα. Το θερμικό στρες προκαλεί εμβρυϊκό θάνατο παρεμποδίζοντας τη σύνθεση πρωτεϊνών (Edwards & Hansen, 1996) και μειώνοντας την παραγωγή ιντερφερόνης για την αναγνώριση της εγκυμοσύνης (Bilby et al., 2008), ενώ παράλληλα οδηγεί σε αύξηση της οξειδωτικής βλάβης των κυττάρων (Wolfenson et al., 2000), και της έκφρασης γονιδίων που επάγονται από το στρες και σχετίζονται με την απόπτωση (Fear & Hansen, 2011). Η χαμηλή έκκριση προγεστερόνης περιορίζει τη λειτουργία του ενδομητρίου, συνεπώς και την ανάπτυξη εμβρύου (Khodaei-Motlagh et al., 2011). Τα επιβλαβή αποτελέσματα του θερμικού στρες στο έμβρυο είναι πιο εμφανή στα αρχικά στάδια της ανάπτυξής του. Ωστόσο, τα έμβρυα που υποβλήθηκαν σε υψηλές θερμοκρασίες *in vitro* ή *in vivo* μέχρι την 7η ημέρα της ανάπτυξης (βλαστοκύστη) οδήγησαν σε χαμηλότερα ποσοστά εγκυμοσύνης την ημέρα 30 και υψηλότερα ποσοστά εμβρυϊκής απώλειας την 42η ημέρα της κύησης (Demetrio et al., 2007). Ο υποσιτισμός του εμβρύου και ενδεχομένως η καθυστέρηση στην ανάπτυξή του υπό θερμική καταπόνηση επίσης αναφέρθηκαν (Tao & Dahl, 2013).

➤ *Επιδράσεις στην αναπαραγωγική απόδοση των αρσενικών ατόμων*

Ο ταύρος αποτελεί σημαντικό μέλος του κοπαδιού και επομένως η γονιμότητά του είναι εξίσου σημαντική για τη γονιμοποίηση των ωαρίων και το σχηματισμό ενός καλού, βιώσιμου και γενετικά δυναμικού εμβρύου. Είναι γνωστό ότι οι όρχεις των ταύρων πρέπει να είναι σε θερμοκρασία 2-6 °C χαμηλότερη από τη θερμοκρασία του σώματος ώστε να παραχθεί ένα γόνιμο σπέρμα. Ως εκ τούτου, η αυξημένη θερμοκρασία των όρχεων που οφείλεται σε θερμικό στρες, μπορεί να προκαλέσει αλλαγές σε σημαντικές βιοχημικές παραμέτρους που οδηγούν σε προβλήματα στειρότητας στους ταύρους. Η σημαντική εποχική διαφορά στα χαρακτηριστικά του σπέρματος έχει αναφερθεί σε διάφορες μελέτες (Cardozo et al., 2006, Balic et al., 2012, Mishra et al., 2013, Rahman et al., 2013, Bhakat et al., 2014). Πιο συγκεκριμένα έχει γίνει αναφορά σε εποχιακές επιδράσεις στις αλλαγές στον όγκο των όρχεων, τα ορμονικά προφίλ, τη σεξουαλική συμπεριφορά και την ποιότητα του σπέρματος που επηρεάζουν την αναπαραγωγική ικανότητα των αρσενικών ατόμων (Cardozo et al., 2006). Σε μελέτη της εποχικής επίδρασης σε 19 ταύρους του είδους *Bos Taurus*, διαπιστώθηκε ότι το καλοκαίρι το θερμικό στρες επηρέασε αρνητικά την ποιότητα του σπέρματος (Balic et al., 2012). Αναφέρθηκε επίσης ότι οι νεότεροι ταύροι είναι πιο ευαίσθητοι σε αυξημένες θερμοκρασίες αέρα κατά τη διάρκεια των καλοκαιρινών

περιόδων. Επιπλέον έχει παρατηρηθεί ότι τα σπερματοζωάρια υπό συνθήκες θερμικού στρες εμφανίζουν εξαιρετικά μειωμένο ποσοστό γονιμοποίησης σε σύγκριση με φυσιολογικά ή μη θερμικά στρεσαρισμένα σπερματοζωάρια (Rahman et al., 2013). Ως εκ τούτου, το θερμικό στρες μειώνει σημαντικά τη σύλληψη καθώς και τα ποσοστά γονιμότητας, όπως επίσης και τη φυσική κατάσταση του αρσενικού.

1.6. Στρατηγικές για τη βελτίωση του θερμικού στρες

Οι φυσικές τροποποιήσεις του περιβάλλοντος, η διατροφική διαχείριση και η γενετική επιλογή θερμοαθεκτικών φυλών αποτελούν βασικά στοιχεία για τη βιώσιμη κτηνοτροφία σε θερμά κλίματα (Atrian & Shahryar, 2012).

1.6.1. Φυσικές τροποποιήσεις του περιβάλλοντος

Η πιο κοινή προσέγγιση για τη βελτίωση του θερμικού στρες στα ζώα, είναι να μειώνεται η θερμοκρασία του περιβάλλοντος με την παροχή σπιτιού ή σκιάς (μαζί με ζωοτροφές και πόσιμο νερό), με τη χρήση ανεμιστήρων, ψεκαστών σταγονιδίων νερού υψηλής πίεσης ή νεφελοποιητών και πιθανώς ψυχόμενων δεξαμενών (Atrian & Shahryar, 2012). Η τροποποίηση του μικροπεριβάλλοντος για τη βελτίωση του μηχανισμού που στοχεύει στον περιορισμό της θερμότητας και κατ' επέκταση την ανακούφιση από το θερμικό στρες, είναι ένα από τα σημαντικότερα μέτρα που πρέπει να ληφθούν υπόψη. Η χρήση τους μπορεί να έχει και παράπλευρα οφέλη με τη διαβροχή του τριχώματος και του δέρματος των ζώων και τη μείωση της θερμοκρασίας του σώματός τους μέσω της εξάτμισης των σταγονιδίων του νερού. Τα γαλακτοπαραγωγά βοοειδή που μεταχειρίστηκαν με ψεκαστήρες αύξησαν την παραγωγή γάλακτος, βελτίωσαν την αναπαραγωγική απόδοση, όπως επίσης και τη μετατροπή των ζωοτροφών στο γάλα (Wolfenson, 2009). Η σκίαση είναι ένας από τους φθηνότερους τρόπους για να τροποποιηθεί το περιβάλλον ενός ζώου κατά τη διάρκεια των θερμών περιόδων. Για τα ζώα σε εξωτερικούς χώρους, η παροχή σκιάς (φυσική ή τεχνητή) είναι μία από τις απλούστερες και οικονομικά αποδοτικότερες μεθόδους για την ελαχιστοποίηση της θερμότητας από την ηλιακή ακτινοβολία. Τα δέντρα είναι πολύ αποτελεσματικά και φυσικά μέσα που παρέχουν σκίαση στα ζώα σε συνδυασμό με ευεργετική ψύξη καθώς η υγρασία εξατμίζεται από τα φύλλα. Τα τεχνητά μέσα σκίασης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την προστασία από τις επιπτώσεις της ηλιακής ακτινοβολίας όταν δεν υπάρχει στο περιβάλλον φυσική σκίαση. Διάφοροι τύποι υλικών στέγασης μπορούν να χρησιμοποιηθούν, από μέταλλο μέχρι και συνθετικά υλικά για κατασκευές σκίασης μεταξύ των οποίων καλύτερη θεωρείται μια γαλβανισμένη ή αλουμινένια οροφή.

1.6.2. Διατροφική διαχείριση

Οι διατροφικές τροποποιήσεις θα μπορούσαν να βοηθήσουν τα ζώα να διατηρήσουν την ομοιόστασή τους ή να αποτρέψουν ανεπάρκειες σε θρεπτικές ουσίες που προκύπτουν από το θερμικό στρες. Κατά τη διάρκεια θερμών περιόδων μειώνονται τα θρεπτικά συστατικά που είναι διαθέσιμα για απορρόφηση ενώ αυτά χρησιμοποιούνται λιγότερο αποτελεσματικά. Η μείωση της κατανάλωσης τροφής λόγω του θερμικού στρες μπορεί να αντισταθμιστεί από την αύξηση της περιεκτικότητας της τροφής σε θρεπτικά συστατικά (πρωτεΐνες και ενέργεια). Οι χαμηλής ποιότητας χονδροειδείς ζωοτροφές (έχουν αποκλειστικά φυτική προέλευση) παράγουν περισσότερη θερμότητα λόγω των ζυμώσεων στη μεγάλη κοιλία ενώ οι υψηλής ποιότητας χονδροειδείς τροφές ζυμώνονται πιο γρήγορα και προκαλούν μικρότερη παραγωγή θερμότητας. Επίσης, επιλέγονται περισσότερο συμπυκνωμένες τροφές (μπορεί να έχουν φυτική, ζωική ή ανόργανη προέλευση) εις βάρος των χονδροειδών διότι παράγουν λιγότερη θερμότητα στη μεγάλη κοιλία. Το σιτηρέσιο θα πρέπει να έχει περιεχόμενο σε πρωτεΐνες μεγαλύτερο του 18% σε ξηρή βάση, καθώς η υπερφόρτωση της τροφής απαιτεί περισσότερη ενέργεια για την εξάλειψη της περίσσειας αζώτου ως ουρίας. Η βελτιστοποίηση της μη διαβαθμισμένης πρωτεΐνης βελτιώνει την απόδοση του γάλακτος σε θερμά κλίματα (West, 1999). Ο δείκτης DMI (dry matter intake) και η απόδοση γάλακτος αυξήθηκαν για τις αγελάδες που τράφηκαν με δίαιτες που περιείχαν 14% έναντι 17 ή 21% ADF (acid detergent fiber), ένα μέτρο συγκέντρωσης των ινών στα χόρτα. Η αύξηση της διατροφικής περιεκτικότητας σε λιπαρά βελτίωσε την απόδοση της γαλακτοκομικής παραγωγής κατά τη ζεστή εποχή (Linn et al., 2004). Κατά τη διάρκεια των θερμών περιόδων είναι λογικό να χρησιμοποιούνται ζωοτροφές που περιέχουν σιτηρέσια χαμηλής περιεκτικότητας σε ίνες, καθώς το λίπος αποδίδει λιγότερη θερμότητα, σε σύγκριση με το άμυλο και τις ινώδεις ουσίες, προστατεύοντας τα ζώα μέσω της χαμηλότερης παραγωγής μεταβολικής θερμότητας (Atrian & Shahryar, 2012). Το θερμικό στρες προκαλεί οξειδωτική βλάβη η οποία θα μπορούσε να ελαχιστοποιηθεί με τη συμπλήρωση των βιταμινών C, E και A και επίσης ορυκτών όπως ο ψευδάργυρος (McDowell, 1989). Η βιταμίνη E και C δρουν ως αναστολείς της υπεροξειδωτικής λιπιδίων που προκαλείται από την επίδραση ριζών υπεροξυλίου. Η χρήση βιταμίνης C σε συνδυασμό με συμπληρώματα ηλεκτρολυτών, βρέθηκε ότι ανακουφίζει τα ζώα από το οξειδωτικό στρες και ενισχύει την κυτταρική ανοσία των βουβαλίων (Sunil Kumar et al., 2010). Ο West (1999) ανέφερε ότι η κατάσταση Na^+ και K^+ στο σώμα παρέμεινε κανονική κατά τη διάρκεια του θερμικού στρες με τη χρήση συμπληρωμάτων ηλεκτρολυτών που θα μπορούσε να οφείλεται σε καλύτερη ρύθμιση της οξεοβασικής ισορροπίας στο αίμα. Η συμπλήρωση της διατροφής με προϊόντα ζύμης παίζει σημαντικό ρόλο στην αφομοίωση των θρεπτικών ουσιών, μεταβάλλοντας την παραγωγή πτητικών λιπαρών οξέων, μειώνοντας την παραγωγή της αμμωνίας και αυξάνοντας τον πληθυσμό των μικροοργανισμών στον προστόμαχο. Η ζωντανές ζύμες αναφέρονται επίσης ως ωφέλιμες για τη διατροφή και την παραγωγικότητα μικρών μηρυκαστικών (Stella et al., 2007).

1.6.3. Γονίδια που σχετίζονται με το θερμικό στρες και γενετική επιλογή

Η πρόοδος στις περιβαλλοντικές τροποποιήσεις και στη διατροφική διαχείριση μερικώς περιορίζουν την επίδραση της θερμικής πίεσης στην απόδοση των ζώων κατά τις θερμότερες εποχές. Ωστόσο, πρέπει να εξελιχθούν μακροπρόθεσμες στρατηγικές για την προσαρμογή στην αλλαγή του κλίματος, οι οποίες θα περιορίσουν το οικονομικό κόστος. Μεταξύ των ζωικών ειδών υπάρχουν διαφορές όσον αφορά την ανοχή στις υψηλές θερμοκρασίες (Das et al., 2016). Έτσι, η επιλογή των ζώων που επηρεάζονται γενετικά λιγότερο από το θερμικό στρες μπορεί να συμβάλει στην αύξηση της παραγωγής κατά τη διάρκεια ιδιαίτερα θερμών περιόδων και το πρώτο βήμα που σχετίζεται με αυτό είναι η ανίχνευση γονιδίων που ανταποκρίνονται ειδικά στο θερμικό στρες (Kadzere et al., 2002, West, 2003). Ως εκ τούτου, μια ακριβής και αποτελεσματική μέθοδος μέτρησης της ανοχής στη θερμότητα σε μια γενετική βάση είναι σημαντική. Οι πρόσφατες τεχνολογίες με συστήματα ανίχνευσης για τα γονίδια και τα μονοπάτια στα οποία συμμετέχουν, κάτω από διάφορες πειραματικές συνθήκες, μπορούν να βοηθήσουν στην ταυτοποίηση των γονιδιωματικών περιοχών στόχων και είναι δυνατό να ανιχνευθούν τα κύρια γονίδια και τα μονοπάτια που εμπλέκονται στην απόκριση στο θερμικό στρες στα ζώα (Collier et al., 2006, Sakatani et al., 2012). Η αναγνώριση των ανθεκτικών στη θερμότητα ζώων σε φυλές υψηλής παραγωγής θα είναι χρήσιμη μόνο εάν τα ζώα αυτά είναι σε θέση να διατηρούν υψηλή παραγωγικότητα και επιβίωση όταν εκτίθενται σε συνθήκες θερμικής καταπόνησης (Das et al., 2016). Τα βοοειδή με κοντότερο τρίχωμα, μεγαλύτερης διαμέτρου και πιο ανοιχτό σε χρώμα είναι πιο προσαρμοσμένα σε ζεστά περιβάλλοντα από εκείνα με μακρύτερες τρίχες και πιο σκούρα χρώματα (Bernabucci et al., 2010). Αυτός ο φαινότυπος έχει χαρακτηριστεί σε τροπικά βοοειδή *B. Taurus* (senepol και carona), και αυτό το επικρατές γονίδιο σχετίζεται με αυξημένο ρυθμό εφίδρωσης, χαμηλότερη RT και χαμηλότερη RR σε ομόζυγα βοοειδή κάτω από θερμές συνθήκες (Mariasegaram et al., 2007).

Τα ζώα ανταποκρίνονται στο θερμικό στρες μέσω μιας εξελικτικά διατηρημένης διεργασίας ρυθμίζοντας τη λειτουργία των πρωτεϊνών και τη διαφορετική γονιδιακή έκφραση (Lindquist & Craig, 1988, Feder & Hofmann, 1999, Kregel, 2002). Ωστόσο, πολύ λίγες πληροφορίες είναι διαθέσιμες σχετικά με το πλήρες σύνολο γονιδίων που επηρεάζονται από το θερμικό στρες λόγω των σύνθετων φυσιολογικών δράσεων των γενετικών παραγόντων. Μια προσέγγιση για την ταυτοποίηση των γονιδίων που σχετίζονται με την απόκριση στο θερμικό στρες είναι η χρήση μικροσυστοιχιών γονιδιακής έκφρασης, για τον εντοπισμό αλλαγών στην έκφραση γονιδίων κατά τη διάρκεια οξείας και χρόνιας θερμικής καταπόνησης. Τα γονίδια που προσδιορίζονται ως βασικά για τη διαδικασία της θερμικής ανοχής, θα πρέπει στη συνέχεια να χαρτογραφηθούν στη χρωμοσωμική τους θέση και οι αλληλουχίες αυτών των γονιδίων θα πρέπει να καθοριστούν προκειμένου να διαπιστωθεί εάν υπάρχουν πολυμορφισμοί ενός νουκλεοτιδίου (SNPs) που σχετίζονται με αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση ή την

πρωτεϊνική λειτουργία (Chan et al., 2010). Η ταυτοποίηση των SNPs που σχετίζονται με τη μεταβολή της αντοχής των ζώων ή την ευαισθησία στο θερμικό στρες θα επιτρέψει τη διαλογή της παρουσίας του ζώου ή την απουσία επιθυμητών ή ανεπιθύμητων αλληλόμορφων (Hayes et al., 2009). Με την ανάπτυξη μοριακών μεθόδων, υπάρχουν νέες ευκαιρίες για τον χαρακτηρισμό της γονιδιακής έκφρασης και την αναγνώριση των κυριότερων κυτταρικών αποκρίσεων στο θερμικό στρες. Ωστόσο, η συνεχής γενετική επιλογή με στόχο τη μεγαλύτερη απόδοση έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη ευαισθησία απέναντι στο θερμικό στρες και πτωτική τάση της καμπύλης γαλουχίας, καθώς και την κακή ποιότητα γάλακτος των γαλακτοπαραγωγών ζώων κατά τη θερινή περίοδο (Kadzere et al., 2002).

Πρόσφατες έρευνες αποκάλυψαν πως υπεύθυνο για τις αποκρίσεις στο θερμικό στρες είναι ένα δίκτυο μεταγραφικών παραγόντων θερμικού σοκ (HSFs) (Pirkkala et al., 2001, Page et al., 2006). Υπάρχουν τέσσερις μορφές HSF, αλλά ο HSF-1 θεωρείται ο πρωταρχικός παράγοντας μεταγραφής που εμπλέκεται στην αντίδραση θερμικού σοκ (Akerfelt et al., 2007). Η ρύθμιση της δραστηριότητας HSF-1 έχει αναφερθεί ότι ελέγχεται σε μεγάλο βαθμό μετά τη μετάφραση και όχι στο επίπεδο της σύνθεσης / αποικοδόμησης του μεταγραφικού παράγοντα (Voellmy & Boellmann, 2007). Μόλις ενεργοποιηθεί το μονομερές HSF-1 τριμερίζεται με άλλα μόρια HSF-1 που είναι απαραίτητα για τη δέσμευση του DNA (Sarge et al., 1993). Το ενεργοποιημένο σύμπλοκο μπορεί τότε να εισέλθει στον πυρήνα και να αρχίσει τη μεταγραφή πρωτεϊνών θερμικού σοκ.

Επιπλέον, ο κεντρικός ρόλος των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (HSPs) έχει περιγραφεί καθώς προστατεύουν από την υπερθερμία και την εγκεφαλική ισχαιμία κατά τη διάρκεια θερμικού εγκεφαλικού επεισοδίου (Lee et al., 2006). Έχει υποτεθεί ότι οι εκκρινόμενες HSPs λειτουργούν ως σήμα συναγερμού για το ανοσοποιητικό σύστημα, ενώ έχει αποδειχθεί ότι βελτιώνουν την επιβίωση των νευρικών κυττάρων που υποβάλλονται σε περιβαλλοντικούς και μεταβολικούς στρεσογόνους παράγοντες (Tytell, 2005, Fleshner & Johnson, 2005). Οι κύριες οικογένειες των HSPs είναι οι HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 και τα μικρά HSPs (μεγέθους κάτω των 30 kDa). Οι HSPs έχουν έναν κρίσιμο ρόλο στην ανάκτηση των κυττάρων από το στρες και στην κυτταροπροστασία καθώς επίσης και στην προστασία των κυττάρων από επακόλουθες προσβολές. Η έκφραση γονιδίου Hsp υπό μεταβολές θερμικού στρες περιλαμβάνει: (i) Ενεργοποίηση του HSF-1. (ii) αυξημένη έκφραση γονιδίων HSP και μειωμένη έκφραση και σύνθεση άλλων γονιδίων και πρωτεϊνών, (iii) αυξημένη οξείδωση γλυκόζης και αμινοξέων και μειωμένο μεταβολισμό λιπαρών οξέων, (iv) ενεργοποίηση του ενδοκρινικού συστήματος ως απόκριση στο στρες, και (v) ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος μέσω εξωκυτταρικής έκκρισης HSPs. Αν το στρες παραμείνει, αυτές οι μεταβολές γονιδιακής έκφρασης οδηγούν σε μια αλλοιωμένη φυσιολογική κατάσταση που αναφέρεται ως "εγκλιματισμός", μια διαδικασία που ελέγχεται σε μεγάλο βαθμό από το ενδοκρινικό σύστημα. Αν και η ενεργοποίηση των HSPs σε απόκριση του θερμικού στρες είναι πολύ καλά χαρακτηρισμένη, ο πολυμορφισμός σε αυτά τα γονίδια μπορεί να συσχετιστεί με την απόδοση γάλακτος στα θηλάζοντα βοοειδή (Li et al., 2011, Liu et al., 2011). Επιπλέον,

η έκφραση αυτών των γονιδίων θα μπορούσε επίσης να επαληθευθεί για την επίδρασή τους στην απόδοση γάλακτος στις γαλακτοπαραγωγικές αγελάδες κατά την καυτή περίοδο. Αρκετές έρευνες έδειξαν συσχετίσεις κάποιων SNPs (single nucleotide polymorphisms) σε γονίδια HSP με απόκριση στη θερμική καταπόνηση και ανοχή στα εκτρεφόμενα ζώα. Η σύνδεση πολυμορφισμών στο γονίδιο HSP90AB1 με ανοχή στη θερμότητα έχει επίσης αναφερθεί στα βοοειδή Thai, Sahiwal και Frieswal, ενώ πολυμορφισμοί σε γονίδια HSF1, HSP70A1A και HSBP1 έχουν συνδεθεί με θερμοανθεκτικότητα στα βοοειδή Chinese Holstein (Das et al., 2016).

Υπάρχουν γονίδια που δεν είναι HSPs αλλά υφίστανται μεταβολές στην έκφρασή τους ως απόκριση στο θερμικό στρες. Παραδείγματα αποτελούν, το γονίδιο ATP1B2 στις αγελάδες Holstein (Wang et al., 2011) και το γονίδιο ATP1A1 στις αγελάδες jersey μικτού γένους (Das et al., 2015) που παρατηρήθηκε πως σχετίζονταν με θερμοαντοχή. Τα γονίδια αυτά είναι υπεύθυνα για την κωδικοποίηση υπομονάδων του συμπλόκου Na^+/K^+ ATPase. Πολυμορφισμοί (SNPs) στα γονίδια αυτά θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες για την επιλογή και ανάπτυξη θερμοανθεκτικών ζώων σε πρώιμη ηλικία. Επιπλέον, θερμοανθεκτικοί ταύροι μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε στρατηγικές αναπαραγωγής με στόχο την απόκτηση θερμικά προσαρμοσμένων απογόνων.

Το θερμικό στρες έχει σοβαρές επιπτώσεις στην υγεία των ζώων και υποβαθμίζει την ανοσολογική λειτουργία (Strong et al., 2015) ενώ, έχουν βρεθεί συνολικά 84 γονίδια που εμπλέκονται σε ανοσοαπόκριση και εκφράστηκαν διαφορετικά από την επίδραση του θερμικού στρες. Η θερμική καταπόνηση έχει επίσης αναφερθεί ότι οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης των υποδοχέων τύπου Toll (TLRs) (Ju et al., 2014), ειδικά με την αυξημένη έκφραση της HSP70 που ειδικώς δεσμεύει τους υποδοχείς TLR2 και TLR4 και επάγει ανοσορυθμιστικά αποτελέσματα όπως απελευθέρωση κυτοκίνης και χημειοκίνης. Η σηματοδότηση TLR οδηγεί στην ενεργοποίηση της έμφυτης και προσαρμοστικής ανοσίας. Επιπλέον, το θερμικό στρες βρέθηκε να ενεργοποιεί το μονοπάτι σηματοδότησης TLR με την έκφραση γονιδίων όπως τα CD80, CASP8, RIPK1, IFNAR2 και BIRC3 που βρέθηκαν να είναι αυξημένα ως απόκριση στη θερμική καταπόνηση. Επιπλέον, αυξήθηκε η έκφραση αρκετών γονιδίων ιντερλευκίνης (NFIL3, IL8 και IL15) ως απόκριση στο θερμικό στρες. Εκτός από τις οδούς σηματοδότησης TLR, ενεργοποιήθηκαν επίσης αρκετές άλλες οδοί που σχετίζονται με το ανοσοποιητικό σύστημα. Αυτές περιλαμβάνουν την οδό σηματοδότησης υποδοχέων B και T κυττάρων, την επεξεργασία και παρουσίαση αντιγόνου, κάποια μονοπάτια που σχετίζονται με μολύνσεις από ιούς, όπως του απλού έρπητα και του ιού Epstein-Barr, καθώς και αρκετές οδοί που εμπλέκονται σε καρκίνο και μονοπάτια σηματοδότησης MAPK (Srikanth et al., 2016).

Αξίζει να σημειωθεί πως οι μελέτες που αναφέρθηκαν είχαν ως ερευνητικό αντικείμενο πυρηνικά γονίδια, και τη σχέση αυτών με το θερμικό στρες στα κτηνοτροφικά ζώα. Ωστόσο, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον να διερευνηθεί και η συσχέτιση μιτοχονδριακών γονιδίων με το θερμικό στρες, καθώς αρκετές έρευνες έχουν καταδείξει πως το μιτοχονδριακό γονιδίωμα εμπλέκεται σε προσαρμογές που σχετίζονται με περιβαλλοντικές μεταβολές.

1.7. Προσαρμογή mtDNA σε θερμοκρασιακά περιβάλλοντα

Η ενέργεια μπορεί να δαπανηθεί με την εκτέλεση εργασιών ή την παραγωγή θερμότητας (θερμογένεση). Η προσαρμοστική θερμογένεση, ή η ρυθμιζόμενη παραγωγή θερμότητας, επηρεάζεται από τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος και τη διατροφή. Τα μιτοχόνδρια, τα οργάνδια που μετατρέπουν την τροφή σε διοξείδιο του άνθρακα, νερό και ATP, κατέχουν θεμελιώδη ρόλο στην παραγωγή και διασπορά ενέργειας, αλλά και θερμότητας μέσω της διαδικασίας της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Η παραγωγή θερμότητας οφείλεται στο γεγονός ότι πολλές αντιδράσεις στον ενεργειακό μεταβολισμό, όπως εκείνες που καταλύονται από την αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων και εκείνες που καταναλώνουν ATP (για παράδειγμα Na^+/K^+ ATPάση, Ca_2^+ ATPase και ATPάση ακτινομυοσίνης), είναι εξώθερμες. Επιπλέον, έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στην κατανόηση της μοριακής ρύθμισης της ενεργειακής δαπάνης στα μιτοχόνδρια και στους μηχανισμούς του μεταγραφικού ελέγχου των μιτοχονδριακών γονιδίων (Lowell & Spiegelman 2000). Παράλληλα, έχει γίνει αναφορά στην εξέλιξη των μιτοχονδρίων με στόχο την προσαρμογή του ρυθμού της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης σε ειδικές συνθήκες περιβάλλοντος (Das, 2006).

Ο μεταβολισμός των θρεπτικών συστατικών, η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, καθώς και η σύνθεση και χρήση του ATP, αποτελούν συζευγμένες αντιδράσεις με σταθερές ποσότητες αντιδρώντων που παράγουν στοιχειομετρικές ποσότητες προϊόντων σε κάθε στάδιο. Για παράδειγμα, η μετατροπή της γλυκόζης σε CO_2 δημιουργεί σταθερές ποσότητες NADH και FADH_2 , η οξείδωση των NADH και FADH_2 με τη σειρά της δημιουργεί σταθερό αριθμό πρωτονίων που αντλούνται κατά μήκος της εσωτερικής μεμβράνης μιτοχονδρίων, η επανεισαγωγή των πρωτονίων μέσω της συνθετάσης ATP δημιουργεί σταθερές ποσότητες ATP, και τα ενζυμικά βήματα που εκτελούν το κυτταρικό έργο χρησιμοποιούν σταθερές ποσότητες ATP. Έτσι, για να αυξηθεί η θερμογένεση, ο βαθμός «σύζευξης» σε έναν ή περισσότερους από αυτούς τους τόπους πρέπει να αλλάξει (Rolfe & Brown, 1997). Παρόλο που τα διαθέσιμα δεδομένα καταδεικνύουν πως η σύζευξη των περισσότερων αντιδράσεων δεν αλλάζει, υπάρχει μια σταθερά εδραιωμένη θέση αποσύνδεσης που είναι η διαρροή πρωτονίων πίσω από την εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου, παρακάμπτοντας έτσι τη

συνθετάση του ATP και μετατρέποντας την ενέργεια που αποθηκεύεται στην πρωτονιοκινητική δύναμη απευθείας σε θερμότητα. Οι διαρροές των πρωτονίων στα μιτοχόνδρια είναι μια βιοφυσική ιδιότητα των διπλοστοιβάδων πρωτεολιπιδίων (Brand et al., 1999). Μπορούν, επίσης, να καταλύονται από ειδικές πρωτεΐνες εσωτερικής μεμβράνης όπως οι πρωτεΐνες αποσύνδεσης (uncoupling protein) UCP-1, UCP-2 και UCP-3. Μια ακόμα πιθανή θέση αποσύνδεσης αποτελεί η μειωμένη άντληση πρωτονίων από την κυτοχρωμική οξειδάση (σύμπλεγμα IV), με τη μεσολάβηση μιας αλλοστερικά ρυθμιζόμενης ισόμορφης της υπομονάδας VIa της κυτοχρωμικής οξειδάσης που είναι ειδική στην καρδιά και στους μύες (Kadenbach et al., 1998).

Η προσαρμοστική θερμογένεση ορίζεται λειτουργικά ως η παραγωγή θερμότητας σε απόκριση της θερμοκρασίας περιβάλλοντος ή της διατροφής και εξυπηρετεί το σκοπό της προστασίας του οργανισμού από την έκθεση σε θερμοκρασιακά μεταβαλλόμενα περιβάλλοντα. Ο όρος συνήθως αναφέρεται σε προσαρμογές που συμβαίνουν σε ατομικό επίπεδο, ωστόσο μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για προσαρμογές σε πληθυσμιακό επίπεδο ή ακόμα και ανάμεσα σε διαφορετικά είδη που προκύπτουν από αλληλεπιδράσεις μεταξύ οργανισμού και περιβάλλοντος (Lowell & Spiegelman, 2000). Έτσι, οι προσαρμογές των διαφόρων ειδών σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών έχουν αποτελέσει αντικείμενο ενδιαφέροντος πολλών ερευνητών, με στόχο τον προσδιορισμό των αλλαγών που συμβαίνουν στη φυσιολογία και το μεταβολισμό, αλλά και την εύρεση εκείνων των φαινοτυπικών χαρακτηριστικών που έχουν δυνατότητα προσαρμογής (Angiletta et al., 2015, Angilleta, 2009, White et al., 2012). Μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει, επίσης, και ο προσδιορισμός των γενετικών στοιχείων που σχετίζονται με τις εν λόγω προσαρμογές και οδηγούν σε αυξημένη επιβίωση.

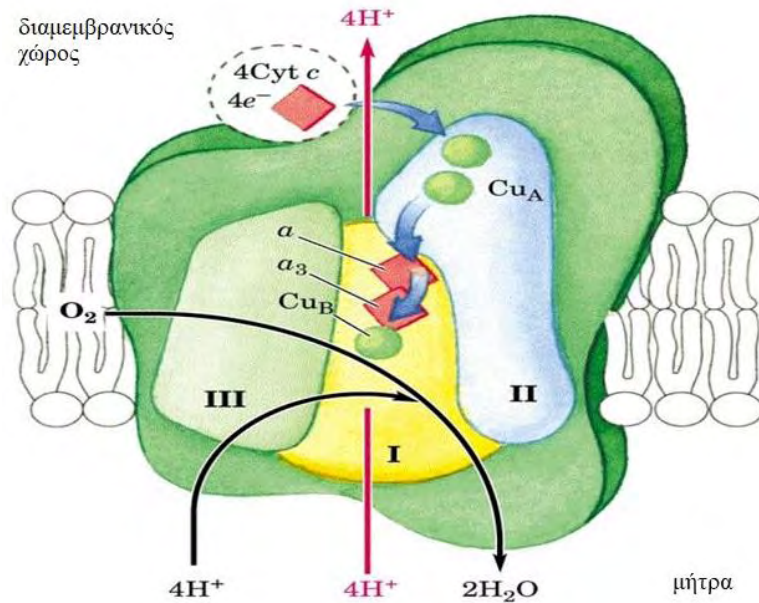
Καθώς η θερμοκρασία παγκοσμίως αυξάνεται, έχει προκύψει η ανάγκη να κατανοηθούν οι φυσιολογικοί μηχανισμοί που καθορίζουν τη θερμική εξειδίκευση ενός οργανισμού. Η έννοια της θερμικής ανθεκτικότητας, η οποία περιορίζεται από τη διαθεσιμότητα του οξυγόνου (oxygen capacity limited thermal tolerance/OCLTT) έχει προταθεί για την κατανόηση του μηχανισμού θερμικής ανοχής σε διάφορους οργανισμούς (Pörtner, 2002, Pörtner et al., 2007). Σύμφωνα με την υπόθεση OCLTT, σε ακραίες συνθήκες χαμηλής ή υψηλής θερμοκρασίας, προκαλούνται δυσλειτουργίες στον αερόβιο μεταβολισμό, άρα και στην παροχή οξυγόνου που οφείλονται σε αναντιστοιχία μεταξύ προσφοράς και ζήτησης οξυγόνου, ενώ συγχρόνως μπορεί να επηρεάζεται ο αριθμός και η λειτουργική ικανότητα των μιτοχονδρίων (Pörtner, 2001, Pörtner, 2002, Pörtner et al., 2004).

Η εξέλιξη και οι λειτουργικές αλλαγές των μιτοχονδριακών γονιδίων αποτελούν θεμελιώδη χαρακτηριστικά της περιβαλλοντικής προσαρμογής (Dowling et al., 2008, Wallace, 2013, Levin et al., 2014, Morales et al., 2015). Κατά την οξειδωτική φωσφορυλίωση, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, παράλληλα με την ενέργεια παράγεται και θερμότητα (Wallace, 2005, Portner, 2004). Όταν η ισορροπία αυτή διαταράσσεται υπέρ της παραγωγής θερμότητας, η κατάσταση είναι ευνοϊκή για οργανισμούς που διαβιούν σε ψυχρά περιβάλλοντα. Εν αντιθέσει, η υψηλή παραγωγή

θερμότητας καθίσταται επιβλαβής για τους οργανισμούς σε θερμά περιβάλλοντα, καθώς συνδέεται με αυξημένη πρόσληψη τροφής και οξειδωτικό στρες (Portner et al., 1998, Brand, 2000, Somero, 2002, Fangue et al., 2009, Stier et al., 2014a,b). Στη βιβλιογραφία έχουν γίνει αρκετές αναφορές για μεταβολές σε μιτοχονδριακά γονίδια που προσδίδουν προσαρμοστικότητα σε περιβαλλοντικές συνθήκες, σε πολλά είδη οργανισμών, μεταξύ αυτών και του ανθρώπινου. Παράλληλα τονίζεται η σπουδαιότητα των προσαρμογών αυτών για την επιβίωση των οργανισμών στα μεταβαλλόμενα περιβάλλοντα (Wallace 2010b,2013, Cheviron & Brumfield, 2011, Bernatchez et al., 1995, Mishmar et al., 2003, Melo-Ferreira et al., 2005, Dowling et al., 2008, Morales et al., 2015). Χαρακτηριστικά μπορεί να αναφερθεί μία μετάλλαξη στο γονίδιο COIII του mtDNA που έδωσε την ικανότητα σε πληθυσμούς του είδους χήνας *Anser indicus* να πετούν σε μεγάλα υψόμετρα όπου η διαθεσιμότητα του οξυγόνου είναι περιορισμένη (Scott et al., 2011, 2015).

1.7.1. Το σύμπλοκο IV

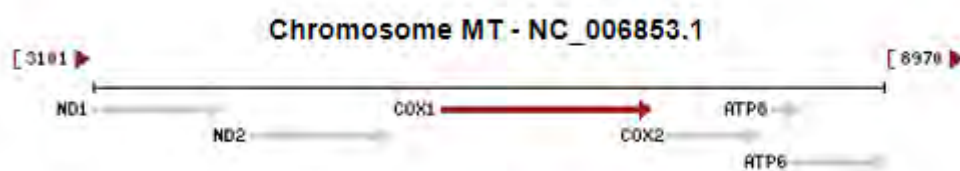
Έχει αναφερθεί πως το μεγαλύτερο μέρος της ενεργειακής απώλειας από την αναπνευστική αλυσίδα, συμβαίνει στην οξειδάση του κυτοχρώματος c (Rolfe & Brown, 1997). Η οξειδάση του κυτοχρώματος c (σύμπλοκο IV) αποτελεί το τέταρτο στη σειρά πολυπρωτεϊνικό σύμπλοκο του συστήματος της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, που βρίσκεται ενσωματωμένο στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, και καταλύει την αναγωγή του μοριακού οξυγόνου σε νερό. Η δομή της βόειας οξειδάσης του κυτοχρώματος c είναι γνωστή και αποτελείται από 13 υπομονάδες εκ των οποίων οι 3 υπομονάδες (COI, II και III) κωδικοποιούνται από μιτοχονδριακά γονίδια, και οι υπόλοιπες 10 υπομονάδες κωδικοποιούνται από πυρηνικά γονίδια (Berg, 2012). Η υπομονάδα I της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (COI) μαζί με την υπομονάδα II (COII) σχηματίζουν τον καταλυτικό πυρήνα του ενζύμου και περιέχουν δυο ομάδες άιμης A (a και a₃) και δύο κέντρα χαλκού (CuA και CuB) που ευθύνονται για τη μεταφορά ηλεκτρονίων. Η τρίτη υπομονάδα COIII έχει δομικό ρόλο και συμμετέχει στην άντληση πρωτονίων (εικόνα 1). Οι υπόλοιπες 10 υπομονάδες (COX4, COX5A, COX5B, COX6A, COX6B, COX6C, COX7A, COX7B, COX7C και COX8) κωδικοποιούνται από το πυρηνικό γονιδίωμα και υπόκεινται σε επεξεργασία ώστε να εισέλθουν στο μιτοχόνδριο και να συναρμολογηθούν με τις υπόλοιπες υπομονάδες, ενώ κατέχουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση και στη σταθεροποίηση του συμπλόκου (Arnold & Kadenbach, 1997).



Εικόνα 1: Δομή του συμπλόκου IV της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (πηγή: τροποποιημένη εικόνα από το διαδίκτυο)

1.7.2. Το γονίδιο COI

Η υπομονάδα I της κυτοχρωμικής οξειδάσης c (COI), είναι η κύρια υπομονάδα του συμπλόκου της οξειδάσης του κυτοχρώματος c. Η COI είναι μια πρωτεΐνη μήκους 514 αμινοξέων, η οποία κωδικοποιείται από το μιτοχondριακό γονίδιο MT-COI που έχει μέγεθος 1545 bp (εικόνα 2). Το γονίδιο αυτό εντοπίζεται με τρεις πιθανές ονομασίες: COX1, COI ή COI (ncbi/gene).



Εικόνα 2: Εντοπισμός του γονιδίου COI στο μιτοχondριακό γονιδίωμα του είδους *B. taurus* (πηγή: ncbi/gene για το γονίδιο COI)

1.8. ΣΚΟΠΟΣ

Στόχος της εν λόγω έρευνας ήταν η βελτίωση της γονιμότητας των αγελάδων γαλακτοπαραγωγής, μέσω εντοπισμού και αξιοποίησης ατόμων με γενετικά καθοριζόμενη θερμοαντοχή. Έτσι, σκοπός της παρούσας εργασίας, και σύμφωνα με όλα όσα αναφέρθηκαν για τις επιδράσεις του θερμικού στρες στα ζώα και τις προσαρμογές του μιτοχονδριακού γονιδιώματος σε μεταβαλλόμενα περιβάλλοντα, ήταν η διερεύνηση της ύπαρξης πολυμορφισμών στο μιτοχονδριακό γονίδιο COI που να σχετίζονται με θερμοανθεκτικότητα σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Δείγματα

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν 107 δείγματα αίματος που συλλέχθηκαν από αγελάδες του είδους *B. taurus* και φυλής Holstein, από φάρμες της περιφέρειας της Θεσσαλίας κατά τη χρονική περίοδο Αυγούστου-Σεπτεμβρίου 2018. Η συλλογή του αίματος έγινε σε σωληνάρια αιμοληψίας με αντιπηκτικό EDTA και τα δείγματα φυλάχθηκαν στην κατάψυξη στους -20°C . Το ακόλουθο διάστημα τα ζώα υποβλήθηκαν σε τεχνητή γονιμοποίηση με σπερματέγχυση και από το σύνολο των 107 αγελάδων γονιμοποιήθηκαν επιτυχώς οι 27.

2.2. Απομόνωση DNA

Ολικό γενωμικό και μιτοχονδριακό DNA απομονώθηκε από τα δείγματα αίματος των αγελάδων με τη χρήση ειδικού kit απομόνωσης της εταιρίας Invitrogen ακολουθώντας της οδηγίες του κατασκευαστή. Ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των απομονωμένων δειγμάτων DNA σε πήκτωμα αгарόζης περιεκτικότητας 1% w/v, για την επιβεβαίωση της επιτυχούς απομόνωσης. Τέλος, τα δείγματα φωτομετρήθηκαν για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του DNA σε κάθε δείγμα εκφρασμένη σε ng/μl.

2.3. PCR-Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για το γονίδιο COI

Η PCR αποτελεί μία *in vitro* μέθοδο που χρησιμοποιείται για την παραγωγή πολλαπλών αντιγράφων ειδικών τμημάτων DNA ή RNA που έχουν καθορισμένο μήκος και αλληλουχία. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην ικανότητα του ενζύμου DNA πολυμεράση να συνθέτει ένα νέο συμπληρωματικό κλώνο DNA προς ένα κλώνο-εκμαγείο, από μικρές ποσότητες ολιγονουκλεοτιδικών αλληλουχιών (εκκινητές) που είναι συμπληρωματικές για τα άκρα της αλληλουχίας-στόχου, παρουσία

τριφωσφορικών δεοξυνουκλετιδίων (dNTPs). Τα βασικά στάδια περιλαμβάνουν τη θερμική αποδιάταξη του δίκλωνου μορίου-στόχου, την υβριδοποίηση των εκκινητών στις συμπληρωματικές αλληλουχίες τους και την επέκτασή τους με ενζυμική σύνθεση από την DNA πολυμεράση. Η μέθοδος είναι αποτελεσματική, ειδική και εξαιρετικά ευαίσθητη, ενώ λαμβάνει χώρα σε ειδικές συσκευές (θερμοκυκλοποιητές) που φέρουν θερμενόμενες πλάκες με δυνατότητα ταχείας εναλλαγής των θερμοκρασιών (Polymerase Chain Reaction, MeSH, 1991).

Η ενίσχυση, αυτή, του τμήματος DNA που μας ενδιαφέρει είναι απαραίτητη καθώς, όλες οι ακόλουθες τεχνικές απαιτούν την ύπαρξη υψηλής συγκέντρωσης DNA για να είναι αποτελεσματικές.

Επομένως, για την ενίσχυση του επιθυμητού γονιδίου COI πραγματοποιήθηκε PCR με εκκινητές, και προς τις δύο κατευθύνσεις του γονιδίου, οι οποίοι ήταν καθολικοί (universal). Το σετ των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε ήταν το εξής: forward ο mlCOIintF και reverse ο jgHCO2198. Ο συνδυασμός αυτών των εκκινητών παρουσιάζει μεγάλο ποσοστό ενίσχυσης και καλής ποιότητας αλληλουχίες ενώ, παρόλο που υπάρχουν εκφυλισμένες περιοχές στις αλληλουχίες των εκκινητών αυτών, δε φαίνεται να εμφανίζουν μη ειδική σύνδεση (Leray, 2013). Οι αλληλουχίες των εκκινητών παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Ετικέτα και αλληλουχία των εκκινητών

Ετικέτα εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή
mlCOIintF	5'-GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC-3'
jgHCO2198	5'-TAIACYTCIGGRTGICCRAARAAYCA-3'

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την ενίσχυση του τμήματος του COI ήταν τα ακόλουθα:

- 1) Σε φιαλίδια των 200μl τοποθετήθηκε 1μl απομονωμένου DNA συγκέντρωσης 100ng/μl. Σε ένα φιαλίδιο αντί για δείγμα προστίθεται ddH₂O (αρνητικός μάρτυρας).
- 2) Ανάλογα με τον αριθμό των δειγμάτων παρασκευάστηκε ένα κοινό διάλυμα (master mix) σε φιαλίδιο των 1,5ml, η σύσταση του οποίου αναφέρεται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3: Σύσταση διαλύματος για την PCR

	Αρχική συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	Όγκοι ανά αντίδραση PCR (50μl)
DNA			1 μl
Buffer Kappa Taq	10x	1x	5 μl
MgCl₂	25 mM	2 mM	1 μl
dNTPs	10 mM	0,2 mM	1 μl
Εκκινητής forward	50 pmol/μl	1 pmol/μl	1 μl
Εκκινητής reverse	50 pmol/μl	1 pmol/μl	1 μl
Taq DNA πολυμεράση	5 U/μl	1 U	0,2 μl
ddH₂O			έως τα 50 μl

- 3) Το master mix μοιράζεται στα φιαλίδια με το DNA και ακολουθεί μία γρήγορη ανάδευση (spin). Ο τελικός όγκος της κάθε αντίδρασης είναι 50μl.
- 4) Τα δείγματα τοποθετούνται στο θερμοκυκλοποιητή, ο οποίος προγραμματίζεται στις ακόλουθες συνθήκες θερμοκρασίας-χρόνου:

Στάδιο 1

Αρχική αποδιάταξη: 95 °C για 5min

Στάδιο 2

A) Αποδιάταξη: 95 °C για 40sec

B) Υβριδοποίηση εκκινητών: 53 °C για 40sec

Γ) Επιμήκυνση: 72 °C για 40sec

Το στάδιο αυτό επαναλαμβάνεται για 35 κύκλους

Στάδιο 3

A) Τελική επιμήκυνση: 72 °C για 10min

B) Συντήρηση των δειγμάτων: 4 °C

Στη συνέχεια ακολουθεί ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αгарόζης περιεκτικότητας 2% w/v, για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων και την επιβεβαίωση της επιτυχούς ενίσχυσης του γονιδίου.

2.4. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό τμημάτων DNA ανάλογα με το μέγεθός τους και βασίζεται στην ιδιότητα του αρνητικά φορτισμένου DNA να κινείται από τον αρνητικό προς το θετικό πόλο όταν εφαρμοστεί κατάλληλη τάση. Το μέγεθος των τμημάτων εκτιμάται με τη βοήθεια ενός μάρτυρα μοριακών μεγεθών τμημάτων DNA (ladder) (Maria S. et al., 2016).

Για την παρασκευή της πηκτής αγαρόζης χρησιμοποιείται διάλυμα TAE 1x, στο οποίο προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης, ανάλογα με την επιθυμητή πυκνότητα της πηκτής. Η περιεκτικότητα της πηκτής σε αγαρόζη εξαρτάται από το μέγεθος των τμημάτων DNA που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν. Έτσι, για την ηλεκτροφόρηση απομονωμένου DNA χρησιμοποιείται πηκτή αγαρόζης περιεκτικότητας 1% w/v (προσθήκη 0,3gr αγαρόζης σε 50ml TAE 1x Electrophoresis Buffer) ενώ, για την ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR χρησιμοποιείται πηκτή 2% w/v (προσθήκη 0,6gr αγαρόζης σε 50ml TAE 1x Electrophoresis Buffer). Ακολουθεί θέρμανση του διαλύματος μέχρι την πλήρη διάλυση της αγαρόζης, ψύξη κάτω από τη βρύση και προσθήκη 2μl της χρωστικής expert green ώστε να γίνουν στη συνέχεια εμφανείς οι ζώνες. Η πηκτή τοποθετείται σε ειδικό καλούπι για να πολυμεριστεί που φέρει ειδικά χτενάκια για το σχηματισμό οπών (πηγαδάκια) στις οποίες προστίθεται τα δείγματα DNA.

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων αναμιγνύονται 3μl loading agarose buffer με 3μl δείγματος όταν πρόκειται για τμήμα DNA που προέρχεται από απομόνωση, ή 5μl δείγματος αν πρόκειται για ενισχυμένο προϊόν PCR. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε ειδικές συσκευές με ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1x και εφαρμογή τάσης 100-150 volts για 15-20 min. Τέλος, η παρατήρηση των ζωνών που σχηματίζονται στην πηκτή γίνεται σε λάμπα υπεριώδους φωτός (UV).

Η παρασκευή διαλύματος TAE 1x γίνεται μετά από αραιώση stock διαλύματος TAE 50x. Για την παρασκευή 500ml διαλύματος TAE 50x, αναμιγνύονται 121gr Tris, 28,5ml acetic acid, 50ml EDTA 0,5M και H₂O μέχρι τα 500ml.

2.5. Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (SSCP): Single-strand conformation polymorphism

Η μέθοδος SSCP δίνει τη δυνατότητα ανίχνευσης μεταλλαγών σε βάσεις μονόκλωνης αλυσίδας DNA. Βασική αρχή της μεθόδου είναι ότι το δίκλωνο DNA όταν αποδιαταχθεί παίρνει μια συγκεκριμένη διαμόρφωση στο χώρο που είναι μοναδική και

εξαρτάται από την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων. Έτσι, ανάλογα με την αλληλουχία των βάσεων, το μονόκλωνο τμήμα θα λάβει μια διαφορετική δευτεροταγή δομή, λόγω της οποίας θα έχει διαφορετική κινητικότητα στο πήκτωμα ακρυλαμίδης. Η διαμόρφωση αυτή μπορεί να είναι αποτέλεσμα μίας και μοναδικής διαφορετικής βάσης, συνεπώς η μέθοδος αυτή παρέχει υψηλή ευαισθησία και είναι ιδανική για τη διάκριση αλληλουχιών DNA που έχουν ελάχιστες διαφορές μεταξύ τους. Η πηκτή ακρυλαμίδης διαθέτει μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα από την πηκτή αγαρόζης και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ηλεκτροφόρηση μικρών τμημάτων DNA (έως 500bp) (Kakavas et al., 2008).

Με τη μέθοδο SSCP γίνεται δυνατή η ανίχνευση της ύπαρξης πολυμορφισμών (SNPs) εντός ενός γονιδίου, μέσω των διαφορετικών προτύπων ζωνώσεων που προκύπτουν από το πήκτωμα ακρυλαμίδης, έτσι ώστε να επιλεχθούν αντιπροσωπευτικά δείγματα που θα σταλούν για αλληλούχηση.

Τα βασικά στάδια της τεχνικής SSCP είναι 4:

A) Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδης 10%

Το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 10% w/v παρασκευάζεται σύμφωνα με τις ποσότητες των αντιδραστηρίων που αναγράφονται στον πίνακα 4:

Πίνακας 4: Συστατικά και ποσότητες για την παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδης

Συστατικά	Ποσότητες
Acrylamide	6,25 gr
Bis-Acrylamide	0,16 gr
Glycerol 50%	6,25 ml
*TBE 10X	3,2 ml
TEMED	62,5 μl
APS 20%	375 μl
ddH ₂ O έως	62,5 ml

*TBE 10x (1lt): 60,5gr Tris + 30,85gr Boric acid + 40ml EDTA 0,5M + H₂O μέχρι το 1lt

Σε ποτήρι ζέσεως προστίθεται τα τέσσερα πρώτα συστατικά του παραπάνω πίνακα με μικρή ποσότητα ddH₂O και αναδεύονται μέχρι την πλήρη διάλυσή τους. Στη συνέχεια, το διάλυμα διηθείται, ογκομετρείται σε τελικό όγκο 62.5 ml και τοποθετείται σε κωνική φιάλη. Τέλος προστίθενται το TEMED και το APS 20% που είναι υπεύθυνα για την πήξη του gel, και όλο το διάλυμα αποχύνεται στο ειδικά διαμορφωμένο εκμαγείο τζαμιών που έχει ήδη προετοιμαστεί. Η ολοκλήρωση του πολυμερισμού και σχηματισμός του πηκτώματος συμβαίνει σε διάρκεια 30 λεπτών.

B) Αποδιάταξη προϊόντων PCR

Για την αποδιάταξη των προϊόντων PCR αναμειγνύονται 10μl δείγματος με 10μl αποδιατακτικού μέσου (denaturation buffer: 95% formamide, 0,05% μπλε της βρομωφαινόλης, 0,05% xylene cyanol, 10mM NaOH) και τοποθετούνται σε συσκευή PCR σε κατάλληλο πρόγραμμα αποδιάταξης για 10min. Δύο λεπτά πριν την ολοκλήρωση της αποδιάταξης τα δείγματα αφαιρούνται από τη συσκευή, τοποθετούνται σε πάγο και τέλος φορτώνονται στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης.

Γ) Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε ειδική συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος TBE 0,5x για 20 ώρες στα 220 volt.

Δ) Χρώση πηκτώματος πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο (silver staining)

1. Μεταφορά του πηκτώματος σε πλαστική μεμβράνη πάνω σε μεταλλικό δίσκο
2. Δύο πλύσεις με διάλυμα οξικού οξέος: 400ml H₂O + 1ml CH₃COOH. Σε κάθε πλύση χρησιμοποιούνται από 200ml του διαλύματος και διαρκεί 2min. Έπειτα ακολουθεί πλύση με H₂O για 2min.
3. Πλύση για 15min με διάλυμα νιτρικού αργύρου (AgNO₃): 1gr στερεού AgNO₃ + 200ml H₂O (καλή ανάδευση).
4. Δύο πλύσεις με H₂O που διαρκούν 2min η καθεμία.
5. Πλύση με διάλυμα που περιέχει: 200ml H₂O + 3gr NaOH + 0,02gr NaBH₄ + 1ml CH₂O (καλή ανάδευση) μέχρι να εμφανιστούν οι ζώνες (περίπου 30 min).
6. Μία σύντομη πλύση με H₂O και αποθήκευση της πηκτής στη μεμβράνη για την ακόλουθη παρατήρησή της.

2.6. Καθαρισμός προϊόντων PCR

Τα προϊόντα PCR πριν σταλούν για αλληλούχηση υπόκεινται σε μία κατεργασία καθαρισμού με σκοπό την απομάκρυνση παραπροϊόντων, όπως επίσης και υπολειμμάτων του ενζύμου της DNA πολυμεράσης, του χλωριούχου μαγνησίου και των dNTPs που χρησιμοποιήθηκαν κατά την εκτέλεση της PCR. Ο καθαρισμός των δειγμάτων από τα στοιχεία αυτά είναι απαραίτητος, διότι η παρουσία τους εμποδίζει τη

διαδικασία της αλληλούχησης. Στην παρούσα εργασία ο καθαρισμός έγινε με τη χρήση του kit SureClean, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Μετά την ολοκλήρωση του καθαρισμού, πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης 2%w/v, για την επιβεβαίωση της επιτυχίας του καθαρισμού.

2.7. Αλληλούχηση των προϊόντων PCR και ανάλυση των δεδομένων

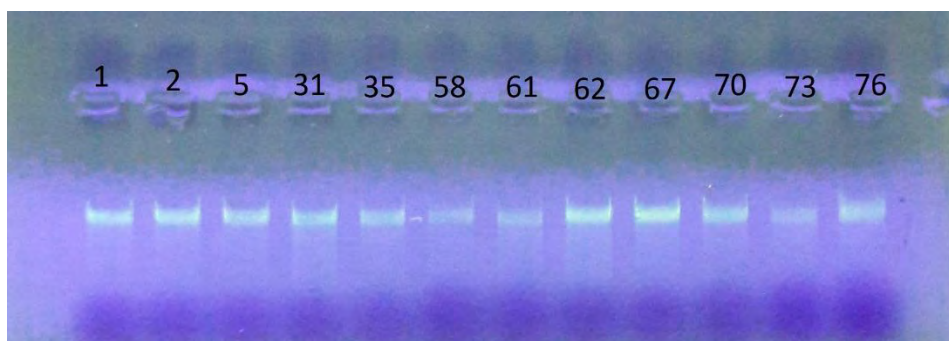
Σκοπός της αλληλούχησης είναι ο προσδιορισμός της αλληλουχίας ενός νουκλεϊκού οξέος. Τα δείγματα αποστέλλονται σε εταιρίες που πραγματοποιούν αλληλούχηση και τα αποτελέσματα λαμβάνονται με τη μορφή χρωματογραφήματος. Στην παρούσα εργασία η τεχνική αλληλούχησης που εφαρμόστηκε ήταν η αλληλούχηση κατά Sanger και τα αποτελέσματα στάλθηκαν με τη μορφή χρωματογραφημάτων. Η αλληλούχηση πραγματοποιείται και προς τις δύο κατευθύνσεις του γονιδίου. Η ανάλυση των χρωματογραφημάτων εκτελείται με τη χρήση κατάλληλων προγραμμάτων βιοπληροφορικής (BioEdit, MEGA) και έτσι γίνεται δυνατή η εξαγωγή της επιθυμητής αλληλουχίας και η ανίχνευση της παρουσίας πιθανών πολυμορφισμών μέσα σε αυτή. Πιο αναλυτικά, στο χρωματογράφημα απεικονίζονται τέσσερις καμπύλες με διαφορετικό χρώμα η καθεμία, όπου το κάθε χρώμα αντιστοιχεί σε ένα διαφορετικό νουκλεοτίδιο. Έτσι, παρατηρώντας το χρώμα της κορυφής της καμπύλης σε κάθε διαφορετική θέση, μπορούμε να συμπεράνουμε ποιο νουκλεοτίδιο βρίσκεται στη θέση αυτή. Η αλληλούχηση γίνεται και για τις δύο αλυσίδες (με τον αντίστοιχο εκκινητή για την κάθε μια) και στη συνέχεια οι δύο αλληλουχίες που προκύπτουν ομοπαρατίθενται με τη χρήση κατάλληλου προγράμματος βιοπληροφορικής (ClustalW) για την εύρεση τυχών λαθών που προκύπτουν κατά τη διαδικασία αυτή. Μετά το τέλος και αυτής της διαδικασίας, προκύπτει η πλήρης, δίκλωνη αλληλουχία του τμήματος που μας ενδιαφέρει.

Οι αλληλουχίες που προκύπτουν από το σύνολο των δειγμάτων που αλληλουχήθηκαν συγκρίνονται τόσο μεταξύ τους όσο και με ήδη γνωστές αλληλουχίες του γονιδίου για τη διερεύνηση της ομολογίας μεταξύ τους, και τον εντοπισμό πολυμορφισμών, με τη βοήθεια του αλγορίθμου BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) στη νουκλεοτιδική βάση δεδομένων του NCBI (National Center for Biotechnology Information). Η αναζήτηση στο BLAST δίνει τη δυνατότητα σύγκρισης μιας αλληλουχίας επερώτησης (query sequence) με μια βιβλιοθήκη ή μια βάση δεδομένων ακολουθιών και να αναγνωρίσει αλληλουχίες που μοιάζουν με την αλληλουχία επερώτησης.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Απομόνωση DNA

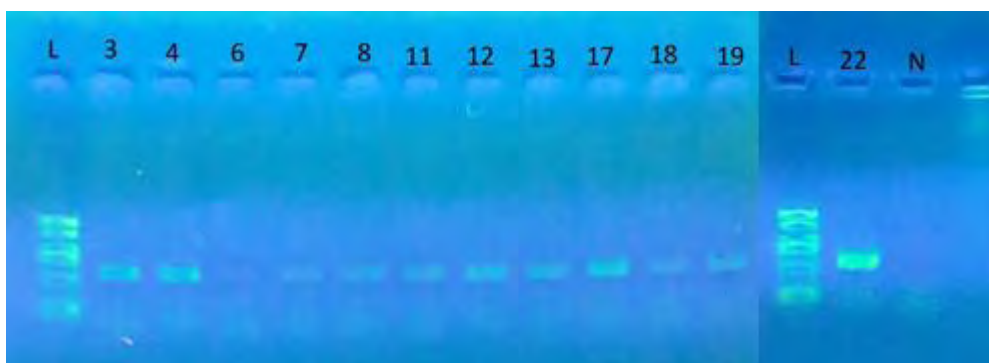
Η απομόνωση γενετικού υλικού από το αίμα που συλλέχθηκε από τις αγελάδες παρείχε DNA υψηλής ποσότητας και καθαρότητας για το μεγαλύτερο αριθμό των δειγμάτων. Η αξιολόγηση της ποσότητας και της ποιότητας του απομονωμένου DNA έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% w/v και φωτομέτρηση μετά από κατάλληλη αραίωση των δειγμάτων. Από τη φωτομέτρηση προέκυψαν τιμές συγκέντρωσης κατά μέσο όρο 100ng/μl και ο λόγος A^{260}/A^{280} ήταν κοντά στο 2, γεγονός που επιβεβαιώνει την καθαρότητα των δειγμάτων. Παράλληλα, από την ηλεκτροφόρηση του DNA στην πηκτή αγαρόζης έγιναν διακριτές έντονες ζώνες κοντά στο ύψος από τα πηγαδάκια γεγονός που υποδηλώνει ότι πρόκειται για γενωμικό DNA (εικόνα 3), καθώς λόγω του μεγάλου μεγέθους του δεν μπορεί να “τρέξει” αρκετά και εντοπίζεται στην κορυφή του πυκτώματος. Επιπλέον, θα αναμέναμε να παρατηρήσουμε χαμηλότερα του γενωμικού DNA μια δεύτερη σειρά ζωνών που θα αντιστοιχούσε στο μιτοχονδριακό DNA, ωστόσο κάτι τέτοιο δεν είναι διακριτό.



Εικόνα 3: Ενδεικτική εικόνα πηκτής αγαρόζης μετά από ηλεκτροφόρηση απομονωμένου DNA - παρατήρηση στο UV. Οι αριθμοί στο πάνω μέρος της εικόνας αντιστοιχούν στους κωδικούς των δειγμάτων/αγελάδων.

3.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Με τη χρήση του κατάλληλου ζεύγους εκκινητών που αντλήθηκαν από τη βιβλιογραφία έγινε εφικτή η ενίσχυση του τμήματος του μιτοχονδριακού γονιδίου COI, με τη μέθοδο της PCR, όπως περιγράφηκε στην πειραματική διαδικασία. Η επιβεβαίωση της επιτυχούς ενίσχυσης πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR που προέκυψαν σε πηκτή αгарόζης 2% w/v (Εικόνα 4). Από το σύνολο των 107 δειγμάτων απομονωμένου DNA, επιτεύχθηκε ενίσχυση του γονιδίου COI στα 102 δείγματα. Στην εικόνα 2 γίνεται διακριτό και το μέγεθος του γονιδίου COI, με τη χρήση ενός μάρτυρα μοριακού μεγέθους (L: ladder), που είναι κοντά στα 350 ζεύγη βάσεων. Επιπλέον, στη θέση του αρνητικού μάρτυρα (N: negative control) δεν έχει σχηματιστεί κάποια ζώνη γεγονός που υποδηλώνει πως δεν υπήρξε κάποια επιμόλυνση κατά τη διαδικασία της PCR και τα προϊόντα που λάβαμε είναι ειδικά για το γονίδιο που μας ενδιαφέρει.



Εικόνα 4: Ενδεικτική εικόνα πηκτής αгарόζης μετά από ηλεκτροφόρηση ενισχυμένου DNA με PCR - παρατήρηση στο UV. Οι αριθμοί στο πάνω μέρος της εικόνας αντιστοιχούν στους κωδικούς των δειγμάτων/αγελάδων, το L στον μάρτυρα μοριακού μεγέθους και το N στον αρνητικό μάρτυρα.

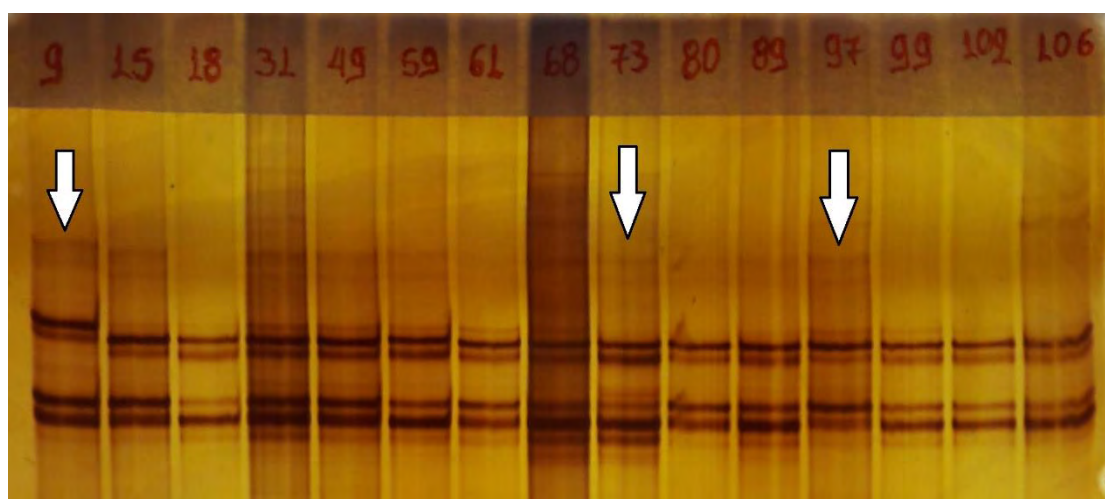
3.3. SSCP- Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας

Μετά την ολοκλήρωση της ενίσχυσης του γονιδίου COI, ακολούθησε αποδιάταξη των προϊόντων PCR και κάθετη ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης, σύμφωνα με τη μέθοδο SSCP, όπως περιγράφεται στο πειραματικό μέρος. Από τα

αποτελέσματα της SSCP και παρατηρώντας τις εικόνες που λάβαμε από κάθε gel, διαπιστώσαμε την παρουσία διαφορετικών προτύπων ζωνώσεων (θεωρούμε πως τα ίδια πρότυπα αντιστοιχούν στην ίδια αλληλουχία). Για το λόγο αυτό επιλέχθηκαν κάποια αντιπροσωπευτικά δείγματα και μετά από καθαρισμό στάλθηκαν για αλληλούχηση.

Σύμφωνα με την αρχή της μεθόδου η ύπαρξη διαφορετικών προτύπων στην SSCP παραπέμπει στην παρουσία σημειακών διαφορών εντός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των συγκεκριμένων δειγμάτων. Ωστόσο δεν παρατηρούμε έντονες διαφορές στην κινητικότητα των δειγμάτων, εφόσον πρόκειται για αλληλουχίες του ίδιου γονιδίου και είναι αναμενόμενο να έχουν υψηλό ποσοστό ομοιότητας μεταξύ τους. Αξίζει, επίσης, να αναφερθεί πως η τεχνική αυτή παρέχει μία πρώτη ένδειξη για την ύπαρξη μιας πολυμορφικής θέσης μέσα στην αλληλουχία και όχι την ακριβή θέση του πολυμορφισμού. Επόμεως, καθίσταται αναγκαία η αλληλούχηση των προϊόντων PCR για την επιβεβαίωση των πολυμορφικών σημείων.

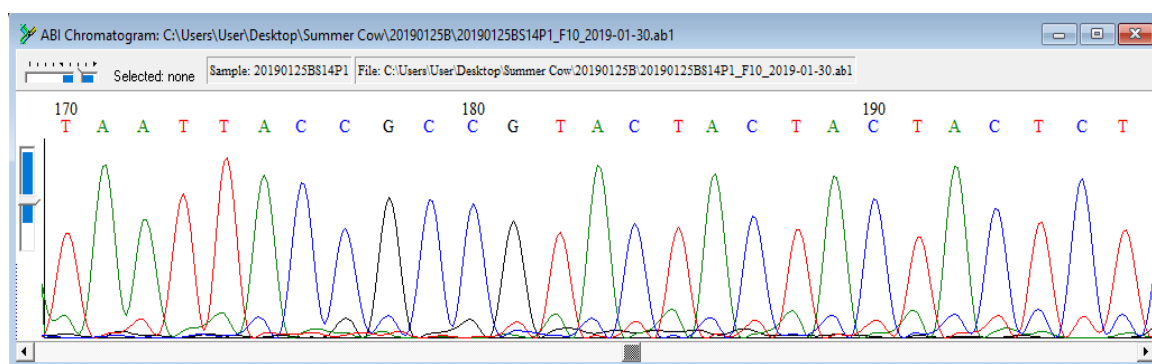
Χαρακτηριστικά μπορεί να αναφερθεί το παράδειγμα της εικόνας 5, όπου παρουσιάζονται ενδεικτικά κάποια δείγματα σε πηκτή πολυακρυλαμίδης. Πιο συγκεκριμένα παρατηρούμε ότι στο δείγμα 9 (επισημαίνεται με το λευκό βέλος) η μία από τις τρεις βασικές ζώνες που διακρίνονται, βρίσκεται ψηλότερα συγκριτικά με τις αντίστοιχες ζώνες των υπόλοιπων δειγμάτων. Συνεπώς, το δείγμα 9 είναι φανερό πως φέρει κάποιο πολυμορφισμό. Τα δείγματα 73 και 97 παρουσιάζουν, επίσης, διαφορετικά πρότυπα ζωνώσεων. Με την ίδια λογική επιλέχθηκαν και τα υπόλοιπα δείγματα που στάλθηκαν για αλληλούχηση. Οι λοιπές ζώνες που εμφανίζονται στην πηκτή πολυακρυλαμίδης αντιστοιχούν σε παραπροϊόντα που προέκυψαν κατά την ενίσχυση του γονιδίου.



Εικόνα 5: Ενδεικτική εικόνα πηκτής πολυακρυλαμίδης που προέκυψε από την τεχνική SSCP. Με λευκά βέλη σημειώνονται τα δείγματα που εμφάνισαν διαφορετικά πρότυπα ζωνώσεων.

3.4. Αλληλούχηση

Τα δείγματα που επιλέχθηκαν από τη μέθοδο SSCP στάλθηκαν σε εταιρία που πραγματοποίησε αλληλούχηση (Sanger) σε ειδικό αναλυτή, με τη χρήση εκκινητών συμπληρωματικών για τα άκρα του γονιδίου COI. Όλες οι αλληλουχίες διαβάστηκαν και προς τις δύο κατευθύνσεις (forward και reverse) για μεγαλύτερη αξιοπιστία και τα αποτελέσματα λήφθηκαν με τη μορφή χρωματογραφήμάτων τα οποία επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα βιοπληροφορικής BioEdit (εικόνα 6).



Εικόνα 6: Ενδεικτική εικόνα χρωματογραφήματος από τμήμα αλληλουχίας όπως προέκυψε από την αλληλούχηση του γονιδίου COI με τον εκκινητή forward.

Αφού οι αλληλουχίες που προέκυψαν από τους δύο εκκινητές επεξεργαστούν κατάλληλα για την απαλοιφή του θορύβου από τα άκρα, ακολουθεί ομοπαράθεσή τους με το πρόγραμμα ClustalW για την ανίχνευση πιθανών λαθών. Έτσι, τελικά προκύπτει μία αλληλουχία για κάθε δείγμα.

Το σύνολο των αλληλουχιών που αντιστοιχούν σε κάθε δείγμα, επεξεργάζεται με το πρόγραμμα MEGA και οι αλληλουχίες στοιχίζονται και συγκρίνονται μεταξύ τους για την εύρεση διαφορετικών βάσεων. Οι αλληλουχίες που ανακτήσαμε αποτελούν τμήμα του γονιδίου COI και είναι μήκους 315 ζευγών βάσεων. Από τη διαδικασία αυτή διακρίναμε τρία διαφορετικά πρότυπα αλληλουχιών (Α, Β και Γ) για το γονίδιο COI, τα οποία αντιστοιχούν στα 102 άτομα του πληθυσμού που μελετήθηκε (εικόνα 7). Πιο συγκεκριμένα στην εικόνα 7 φαίνεται μία βασική αλληλουχία (Γ), και άλλες δύο οι οποίες διαφέρουν σε μία βάση συγκριτικά με τη βασική αλληλουχία. Οι αλληλουχίες Α και Β φέρουν από μία μετάλλαξη (αδενίνη αντί για γουανίνη) στις θέσεις 234 και 126 αντίστοιχα. Τα στοιχεία αυτά σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα της SSCP οδηγούν στην ακόλουθη διάκριση των 102 ατόμων που μελετήθηκαν:

- πρότυπο Α → 1 άτομο
- πρότυπο Β → 1 άτομο
- πρότυπο Γ → 100 άτομα


```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
A  CCCTTAGCAGGCAACCTAGCCCATGCAGGAGCTTCAGTAGATCTAACCATTTTCTCTTTACACTTAGCAGGAGTTTCTCAATTTTAGGAGCC
B  CCCTTAGCAGGCAACCTAGCCCATGCAGGAGCTTCAGTAGATCTAACCATTTTCTCTTTACACTTAGCAGGAGTTTCTCAATTTTAGGAGCC
Γ  CCCTTAGCAGGCAACCTAGCCCATGCAGGAGCTTCAGTAGATCTAACCATTTTCTCTTTACACTTAGCAGGAGTTTCTCAATTTTAGGAGCC

      110     120     130     140     150     160     170     180     190
A  TCATTACAACAATTATCAACATAAAGCCCCCGCAATGTCACAATACCAAACCCCTCTGTTGATGATCCGTAATAATTACCGCCGTACTAC
B  TCATTACAACAATTATCAACATAAAGCCCCCGCAATGTCACAATACCAAACCCCTCTGTTGATGATCCGTAATAATTACCGCCGTACTAC
Γ  TCATTACAACAATTATCAACATAAAGCCCCCGCAATGTCACAATACCAAACCCCTCTGTTGATGATCCGTAATAATTACCGCCGTACTAC

      210     220     230     240     250     260     270     280     290
A  CTCGCTCCCTGTATTAGCAGCCGGCATCACAATATTATTAAACAGACCGGAACCTAAATACAACCTTCTTCGACCCGGCAGGAGGAGGAGACCC
B  CTCGCTCCCTGTATTAGCAGCCGGCATCACAATGCTATTAAACAGACCGGAACCTAAATACAACCTTCTTCGACCCGGCAGGAGGAGGAGACCC
Γ  CTCGCTCCCTGTATTAGCAGCCGGCATCACAATGCTATTAAACAGACCGGAACCTAAATACAACCTTCTTCGACCCGGCAGGAGGAGGAGACCC

      310
A  TATCAACACTTATTC
B  TATCAACACTTATTC
Γ  TATCAACACTTATTC

```

Εικόνα 7: Απεικόνιση των τριών διαφορετικών προτύπων αλληλουχιών. Με κύκλο επισημαίνονται οι θέσεις εντοπισμού των πολυμορφισμών.

Ακόλουθα, έγινε σύγκριση των αλληλουχιών αυτών με την πρότυπη αλληλουχία του γονιδίου COI για το είδος *B. taurus*, η οποία ανακτήθηκε από τη βάση δεδομένων του NCBI (εικόνα 8), με τη βοήθεια του αλγορίθμου BLASTn. Έτσι οι μεταλλάξεις που ανιχνεύσαμε εντοπίστηκαν στις θέσεις 624 και 516 σε ολόκληρο το γονίδιο COI.

Bos taurus mitochondrion, complete genome

NCBI Reference Sequence: NC_006853.1

[GenBank](#) [Graphics](#)

```
>NC_006853.1:5687-7231 Bos taurus mitochondrion, complete genome
ATGTTTCATTAACCGCTGACTATTCTCAACCAGCCATAAAGATATTGGTACCCCTTATCTACTATTTGATG
CTTGGGCCGGTATAGTAGGAACAGCTCTAAGCCTTCTAATTCGCGCTGAATTAGGCCAACCCGGAACTCT
GCTCGGAGACGACCAAATCTACAACGAGTTGTAACCGCACACGCATTTGTAATAATCTTCTTCATAGTA
ATACCAATCATAATTGGAGGATTGCGTAAGTACTGCTTGTCCCTAATAATTGGTGCTCCCGATATAGCAT
TTCCCGAATAAATAATATAAGCTTCTGACTCCTCCCTCCCTCATTCTACTACTCCTCGCATCCTCTAT
AGTTGAAGCTGGGGCAGGAACAGGCTGAACCGTGTACCCTCCCTTAGCAGGCAACCTAGCCCATGCAGGA
GCTTCAGTAGATCTAACCATTTTCTTTTACACTTAGCAGGAGTTTCCCTCAATTTTAGGAGCCATCAACT
TCATTACAACAATTATCAACATAAAGCCCCCGCAATGTCACAATACCAAACCCCTCTGTTTCGTATGATC
CGTAATAATTACCGCGTACTACTACTACTCTCGCTCCCTGTATTAGCAGCCGGCATCACAATGCTATTA
ACAGACCGGAACCTAAATACAACCTTCTTCGACCCGGCAGGAGGAGAGCCCTATTCTATATCAACACT
TATTCTGATTCTTTGGACACCCCGAAGTCTATATTTAATCTTACCTGGGTTTGGGAATAATCTCTCATAT
CGTGACCTACTACTCAGGAAAAAAGAACCATTTCGGATATATGGGAATAGTTTGGGCTATAATGTCAATC
GGATTCTAGGTTTTCATCGTATGAGCCACCATATATTCAGTGTGGAATAGACGTCGACACAGAGCCT
ACTTCACATCAGCCACTATAATTATTGCTATTCCAACCGGGGTAAAAGTCTTCAGCTGATTGGCAACACT
TCATGGAGGTAATATCAAATGGTCTCCTGCTATAATGTGAGCCCTAGGCTTTATTTTCTATTTACAGTA
GGGGGTTTAACTGGAATTGTCTTAGCCAACCTTCCCTCGATATTGTTCTTACGACACATACTACGTTG
TCGCACATTTCCACTATGTTTATCAATAGGAGCTGTATTTGCTATTATAGGGGGATTGTTTCATTGATT
CCCCTATTCTCAGGTTTACTCTCAACGATACATGAGCCAAAATCCACTTCGCAATTATTTGTAGGC
GTCAATATAACCTTCTTCCCAACACTTTCTAGGACTATCTGGCATGCCTCGACGATCTCCGACTACC
CAGATGCATACACAATATGAAATACTATCTCATCAATAGGCTCATTTCCTTAACAGCAGTTATACT
AATAGTTTTTCATCATCTGAGAAGCATTTGCATCTAAACGAGAAGTCTTGACTGTAGACTTAACCACGACA
AATCTAGAATGATTAACGGATGCCCTCCACCATATCACACATTTGAAGAACCACCTATGTTAACCTAA
AATAA
```

Εικόνα 8: Πρότυπη αλληλουχία του γονιδίου COI του είδους *B. taurus*, από τη βάση δεδομένων του NCBI.

Από τα αποτελέσματα αυτά, και μετά από μετατροπή των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών σε αμινοξικές αλληλουχίες, συμπεραίνουμε πως πρόκειται για συνώνυμες μεταλλάξεις. Επομένως, οι μεταλλάξεις αυτές δε μεταβάλλουν το γονιδιακό προϊόν.

Τέλος, αξίζει να αναφερθεί πως οι αγελάδες της παρούσας μελέτης διακρίνονται σε ανθεκτικές και μη ανθεκτικές ανάλογα με το αν κατάφεραν να γονιμοποιηθούν ή όχι αντίστοιχα, ενώ είχαν υποβληθεί σε θερμική καταπόνηση. Τα δύο διαφορετικά πρότυπα που διακρίναμε εντοπίστηκαν σε μη ανθεκτικές αγελάδες, δηλαδή αγελάδες που δεν έμειναν έγκυες.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το θερμικό στρες (heat stress) συμβαίνει όταν οποιοσδήποτε συνδυασμός περιβαλλοντικών συνθηκών, όπως η θερμοκρασία του αέρα, η σχετική υγρασία και η ηλιακή ακτινοβολία, οδηγούν σε υπερβολική αύξηση της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος, υψηλότερη από αυτή που μπορούν να ανεχθούν τα ζώα (θερμικά ουδέτερη ζώνη). Τα ζώα ως απόκριση στην θερμική καταπόνηση που υφίστανται, τροποποιούν κάποιες από τις βασικές φυσιολογικές τους λειτουργίες. Χαρακτηριστικά αναφέρονται η αύξηση του αναπνευστικού ρυθμού, των καρδιακών παλμών και της θερμοκρασίας του ορθού. Ωστόσο, παρά τις προσαρμογές των ζώων ώστε να ανταπεξέλθουν στο θερμικό στρες, έχει παρατηρηθεί πως αυτό επηρεάζει αρνητικά σε μεγάλο βαθμό πολλές παραμέτρους, όπως είναι η φυσιολογική ανάπτυξη, η αναπαραγωγική δραστηριότητα, οι παραγωγικές αποδόσεις καθώς και η ανοχή σε ασθένειες (Das et al., 2016).

Τα γαλακτοπαραγωγικά ζώα, και πιο συγκεκριμένα οι αγελάδες γαλακτοπαραγωγής που αποτελούν το ζωϊκό μοντέλο της παρούσας έρευνας, επηρεάζονται έντονα από τις συνθήκες θερμικής καταπόνησης. Το γεγονός αυτό παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς η μείωση της παραγωγής γάλατος και της δυνατότητας αναπαραγωγής δημιουργεί τεράστια οικονομικά προβλήματα και εγκυμονεί κινδύνους για τη βιωσιμότητα της κτηνοτροφίας τόσο στην Ελλάδα, όσο και σε άλλες χώρες που στηρίζουν την οικονομία τους στον πρωτογενή τομέα παραγωγής.

Για τον περιορισμό των αρνητικών επιδράσεων της θερμικής καταπόνησης και την ανακούφιση των ζώων από το θερμικό στρες, ο άνθρωπος έχει καταφύγει σε τροποποιήσεις του περιβάλλοντος που διαβιούν τα ζώα με στόχο τη μείωση της θερμοκρασίας. Αυτές περιλαμβάνουν την ενίσχυση της φυσικής προστασίας των ζώων με την εξασφάλιση σκιάς και τη χρήση ανεμιστήρων, όπως επίσης και την παροχή δροσερού νερού (Atrian & Shahryar, 2012). Επιπρόσθετα, αναγκαία κρίνεται και η εισαγωγή διατροφικών χειρισμών, ώστε το ενεργειακό περιεχόμενο της τροφής να είναι προσαρμοσμένο στις συγκεκριμένες συνθήκες και να ελαχιστοποιείται η απώλεια ενέργειας με τη μορφή θερμότητας κατά το μεταβολισμό (Das et al., 2016).

Ωστόσο, οι προαναφερθείσες μέθοδοι πολλές φορές είναι οικονομικά δαπανηρές και όχι πλήρως αποτελεσματικές στην αντιμετώπιση της θερμικής καταπόνησης που βιώνουν τα κτηνοτροφικά ζώα. Έτσι, έχει προκύψει η ανάγκη εφαρμογής μακροπρόθεσμων μεθόδων που στηρίζονται στην επιλογή και ανάπτυξη των γενετικά ανθεκτικών ζώων απέναντι στο θερμικό στρες (Kadzere et al., 2002, West, 2003). Έχουν βρεθεί πυρηνικά γονίδια των οποίων η έκφραση επηρεάζεται ως συνέπεια της θερμικής καταπόνησης και αυτά περιλαμβάνουν γονίδια μεταγραφικών παραγόντων θερμικού σοκ (HSFs), γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες θερμικού σοκ (HSPs), όπως επίσης και γονίδια που κωδικοποιούν για υπομονάδες του συμπλόκου Na^+/K^+ ATPase (ATP1A1 και ATP1B2).

Πέραν, όμως, των πολυάριθμων μελετών που αναφέρονται σε πυρηνικά γονίδια και τις μεταβολές που αυτά υφίστανται ως απόκριση στο θερμικό στρες, ένα μεγάλο μέρος ερευνών έχει δείξει τη συμμετοχή και μιτοχονδιακών γονιδίων σε προσαρμογές των οργανισμών κατά τη διάρκεια μεταβαλλόμενων περιβαλλοντικών συνθηκών. Τα μιτοχόνδρια είναι τα οργανίδια που μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης είναι υπεύθυνα για την παραγωγή ενέργειας αλλά και θερμότητας στους οργανισμούς. Η θερμότητα που παράγεται οφείλεται στο γεγονός ότι οι περισσότερες από τις αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά τον ενεργειακό μεταβολισμό είναι εξώθερμες. Επιπλέον, δεδομένου ότι οι αντιδράσεις για την παραγωγή ενέργειας στα μιτοχόνδρια είναι ισχυρά συζευγμένες μεταξύ τους, για να παραχθεί θερμότητα απαιτείται μεταβολή στο βαθμό σύζευξης ανάμεσα στις αντιδράσεις αυτές (Rolfe & Brown, 1997). Στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί μια σταθερή θέση αποσύνδεσης που είναι η διαρροή πρωτονίων πίσω από την εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου, με αποτέλεσμα την παράκαμψη της συνθετάσης του ATP και τη μετατροπή της ενέργειας που μεταφέρεται μέσω των πρωτονίων σε θερμότητα. Ακόμη, ως θέση αποσύνδεσης έχει αναφερθεί και η κυτοχρωμική οξειδάση (σύμπλοκο IV), όταν η άντληση πρωτονίων από αυτή είναι μειωμένη (Kadenbach et al., 1998), με αποτέλεσμα την αύξηση της θερμογένεσης.

Η θερμοκρασία του περιβάλλοντος, ιδίως όταν παρουσιάζει έντονες μεταβολές, επηρεάζει τις φυσιολογικές λειτουργίες των οργανισμών. Ως απόκριση στις συνθήκες αυτές οι οργανισμοί εμφανίζουν προσαρμογές στην παραγωγή θερμότητας (προσαρμοστική θερμογένεση) ώστε να προστατευθούν και να ανταπεξέλθουν στις περιβαλλοντικές μεταβολές. Έτσι, όσον αφορά το μηχανισμό με τον οποίο οι οργανισμοί παρουσιάζουν θερμική ανοχή, χαρακτηριστικά μπορεί να αναφερθεί η υπόθεση της θερμικής ανθεκτικότητας που περιορίζεται από τη διαθεσιμότητα οξυγόνου (OCLTT) που αναφέρεται σε δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων λόγω της μειωμένης παροχής οξυγόνου σε ακραίες υψηλές ή χαμηλές θερμοκρασίες (Pörtner, 2002, Pörtner et al., 2007). Επιπλέον, έχει αναφερθεί πως μεταβολές σε μιτοχονδρικά γονίδια κατέχουν βασικό ρόλο στις περιβαλλοντικές προσαρμογές και παρέχουν στους οργανισμούς το πλεονέκτημα της αυξημένης επιβίωσης (Wallace 2010b, 2013, Cheviron & Brumfield, 2011, Morales et al., 2015). Ως εκ τούτου, έχει προκύψει η ανάγκη για τον προσδιορισμό των γενετικών αυτών στοιχείων που σχετίζονται με τις προαναφερθείσες προσαρμογές, με στόχο τη γενετική βελτίωση των οργανισμών.

Κατά τη διαδικασία της αναπνευστικής αλυσίδας-οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, έχει παρατηρηθεί πως το μεγαλύτερο μέρος της ενέργειας χάνεται στο σύμπλοκο IV, δηλαδή την οξειδάση του κυτοχρώματος c (Rolfe & Brown, 1997) και συνεπώς φαίνεται πως κατέχει βασικό ρόλο στη θερμορύθμιση. Επομένως, στόχος της παρούσας εργασίας ήταν να διερευνηθεί η συσχέτιση του συμπλόκου IV με την ανοχή απέναντι στο θερμικό στρες σε αγελάδες γαλακτοπαραγωγής και πιο συγκεκριμένα εξετάστηκε η ύπαρξη σημειακών πολυμορφισμών (SNPs) στο μιτοχονδριακό γονίδιο COI που κωδικοποιεί την κύρια υπομονάδα του συμπλόκου και η οποία μαζί με τις υπομονάδες II και III είναι υπεύθυνη για την καταλυτική του ενεργότητα.

Για τις ανάγκες της παρούσας εργασίας έγινε λήψη αίματος από ένα σύνολο 107 αγελάδων του είδους *B. taurus* και φυλής Holstein, που προέρχονταν από διαφορετικές φάρμες της Θεσσαλίας, κατά τη θερινή περίοδο. Ακόλουθα, τα ζώα γονιμοποιήθηκαν τεχνητά μέσω σπερματέγχυσης. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε απομόνωση γενετικού υλικού (DNA) από τα δείγματα αίματος και ενίσχυση του γονιδίου ενδιαφέροντος COI μέσω της τεχνικής PCR με τη χρήση κατάλληλων εκκινήτων, οι αλληλουχίες των οποίων αντλήθηκαν από τη βιβλιογραφία (Leray, 2013). Ο έλεγχος τόσο της επιτυχούς απομόνωσης του DNA, όσο και της ενίσχυσης του γονιδίου COI, επιτελέστηκε με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αгарόζης και παρατήρηση στο UV. Έπειτα, με την εφαρμογή της μεθόδου SSCP, έγιναν διακριτά κάποια διαφορετικά πρότυπα αλληλουχιών και σε επόμενο στάδιο επιλέχθηκαν αντιπροσωπευτικά δείγματα και στάλθηκαν για αλληλούχηση, ώστε να γίνει ο ακριβής εντοπισμός των πολυμορφικών θέσεων εντός του γονιδίου.

Μετά από επεξεργασία των αλληλουχιών που λάβαμε από την αλληλούχηση, με τη χρήση κατάλληλων προγραμμάτων βιοπληροφορικής, έγιναν διακριτά 3 διαφορετικά πρότυπα αλληλουχιών που αναφέρονται ως Α, Β και Γ. Το πρότυπο Γ είναι το βασικό και αντιπροσωπεύει το μεγαλύτερο μέρος του πληθυσμού που μελετήθηκε (εμφανίζεται στα 100 από τα 102 άτομα), ενώ τα πρότυπα Α και Β αντιστοιχούν σε ένα άτομο το κάθε ένα. Τα πρότυπα Α και Β φέρουν από μία σημειακή μετάλλαξη εντός των αλληλουχιών με αδερίνη αντί της γουανίνης. Ωστόσο, μετά από μετατροπή των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών σε αμινοξικές, διαπιστώνεται πως οι μεταλλάξεις αυτές είναι συνώνυμες, καθώς προκύπτει το ίδιο αμινοξύ και δεν επιφέρουν καμία αλλαγή στο τελικό γονιδιακό προϊόν.

Συμπερασματικά, από τα αποτελέσματα που λήφθηκαν για το τμήμα του μιτοχονδριακού γονιδίου COI που μελετήθηκε, δεν έγινε ανίχνευση κάποιου πολυμορφισμού, ώστε σε επόμενο στάδιο να συσχετιστεί με πιθανή συμμετοχή του σε θερμική ανοχή στα ζώα. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι οι αγελάδες που μεταχειρίστηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη, ήταν στενά συγκεντρικές μεταξύ του και επομένως ήταν αναμενόμενο να παρουσιάζουν υψηλό ποσοστό ομοιότητας στις αλληλουχίες τους. Επιπρόσθετα, το γονίδιο COI αποτελεί έναν πολύ καλά μελετημένο μοριακό δείκτη ο οποίος τείνει να είναι υψηλά συντηρημένος μέσα στα άτομα του ίδιου είδους, αλλά να παρουσιάζει σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ ατόμων που ανήκουν σε διαφορετικά είδη και αυτό τον καθιστά ως ένα πολύ χρήσιμο μέσο για τη διάκριση και την ταυτοποίηση των οργανισμών μεταξύ των ειδών (Savolainen et al., 2005). Επίσης, αρκετές μελέτες έχουν δείξει πως το σύμπλοκο IV παρουσιάζει μειωμένο ρυθμό μεταλλάξεων, καθώς τα μιτοχονδριακά γονίδια που κωδικοποιούν για τις υπομονάδες του συμπλόκου αυτού (COI-III) φαίνεται πως είναι λιγότερο πολυμορφικά σε σύγκριση με άλλα μιτοχονδριακά γονίδια και αυτό έχει ως αποτέλεσμα να εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα συντήρησης (Pesole et al 1999, da Fonseca et al 2008). Το γεγονός αυτό οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στη δράση της αρνητικής επιλογής στα σύμπλοκα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης (Kerr 2011). Είναι γνωστό, επιπλέον, πως το μιτοχονδριακό γονιδίωμα δέχεται ισχυρή εξελικτική πίεση (γρήγορος ρυθμός εξέλιξης), με συνέπεια οποιαδήποτε μετάλλαξη που δεν προσδίδει κάποιο επιλεκτικό

πλεονέκτημα ή επιφέρει αρνητική επίδραση, να μην μεταβιβάζεται και να εξαφανίζεται. Έτσι, τα μιτοχονδριακά γονίδια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης τείνουν να εμφανίζουν υψηλότερους εξελικτικούς ρυθμούς ώστε να αντισταθμίσουν τα επιβλαβή αποτελέσματα των μιτοχονδριακών μεταλλάξεων. Τέλος, η γενετική βελτίωση των ζώων και στην προκειμένη περίπτωση των αγελάδων, συχνά γίνεται με διαφορετικά κριτήρια όπως το αυξημένο σωματικό βάρος, την υψηλή αναπαραγωγική ικανότητα και γονιμότητα ή την ανοχή σε ασθένειες και όχι απαραίτητα την ανοχή σε υψηλές θερμοκρασίες. Απόρροια αυτού είναι η συνεχής επιλογή συγκεκριμένων χαρακτήρων που σε βάθος χρόνου καθιστά το κοπάδι μονομορφικό, δηλαδή να παρουσιάζει έλλειψη γενετικής ποικιλομορφίας (Charlesworth et al., 1993).

Με βάση τα όσα αναφέρθηκαν, μπορούμε να συμπεράνουμε πως απαιτείται περαιτέρω έρευνα σε μεγαλύτερο τμήμα του γονιδίου COI, όπως επίσης θα μπορούσαν να μελετηθούν και τα υπόλοιπα γονίδια του μιτοχονδρίου που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες. Αυτό κρίνεται αναγκαίο, αφενώς γιατί τα μιτοχόνδρια είναι υπεύθυνα για την αερόβια αναπνοή και συνεπώς έχουν καθοριστικό ρόλο στη διαμόρφωση του μεταβολισμού των οργανισμών και στη θερμογένεση, και αφετέρου τα γονίδια αυτά λόγω αυξημένου εξελικτικού ρυθμού προσαρμόζονται πρώτα. Επιπλέον, προτείνεται να διερευνηθεί μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων, καθώς και διαφορετικά κοπάδια τα άτομα των οποίων να μην είναι συγκενικά μεταξύ τους. Έτσι, σε επόμενο στάδιο θα γίνει εφικτός ο προσδιορισμός πολυμορφισμών εντός των μιτοχονδριακών γονιδίων και εντοπισμός εκείνων των μεταλλάξεων που προσδίδουν στα ζώα το πλεονέκτημα της ανοχής σε ακραίες θερμοκρασίες. Απώτερος στόχος είναι να προκύψουν πληθυσμοί παραγωγικών ζώων που θα είναι γενετικά βελτιωμένα και θα φέρουν επιθυμητά χαρακτηριστικά, τα οποία ιδανικά να είναι κληρονομήσιμα μέσω σχεδιασμένων διασταυρώσεων. Τέλος, παρότι οι μοριακοί δείκτες αποτελούν ένα χρήσιμο εργαλείο για την εκτίμηση της γενετικής ποικιλομορφίας, η ταχύτατη ανάπτυξη των τεχνικών αλληλούχησης και των εργαλείων βιοπληροφορικής σε συνδυασμό με το μειωμένο κόστος που πλέον παρέχουν, καθιστά τις συγχρονές αυτές μεθόδους περισσότερο ελκυστικές και αποτελεσματικές και στρέφει την έρευνα προς αυτή την κατεύθυνση.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdel-Samee, A.M. (1987) The role of cortisol in improving productivity of heat-stressed farm animals with different techniques. Ph.D. Thesis, Faculty of Agriculture, Zagazig University, Zagazig, Egypt.
- Akerfelt, M., Trouillet, D. Mezger, V. and Sistonen, L. 2007. Heat shock factors at a crossroad between stress and development. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1113: 15-27.
- Alamer, M. (2011) The role of prolactin in thermoregulation and water balance during heat stress in domestic animals. *Asian J. Anim. Vet. Adv.*, 6(12): 1153-1169.
- Al-Katanani, Y.M., Webb, D.W. and Hansen, P.J. (1999) Factors affecting seasonal variation in 90-day non return rate to first service in lactating Holstein cows in a hot climate. *J. Dairy Sci.*, 82(12): 2611-2616.
- Angilletta Jr., M. J. (2009). *Thermal Adaptation*. Oxford University Press.
- Angilletta, M. J., Bennett, A. F., Guderley, H., Navas, C. A., Seebacher, F., & Wilson, R. S. (2015). Coadaptation: a unifying principle in evolutionary thermal biology. *Physiological and Biochemical Zoology* : PBZ, 79(2), 282–294.
- Arnold, S., & Kadenbach, B. (1997). Cell Respiration is Controlled by ATP, an Allosteric Inhibitor of Cytochrome-c Oxidase. *European Journal of Biochemistry*, 249(1), 350–354.
- Atrian, P. and Shahryar, H.A. (2012) Heat stress in dairy cows. *Res. Zool.*, 2(4): 31-37.
- Baile, C.A. and Forbes, J.M. (1974) Control of feed intake and regulation of energy balance in ruminants. *Physiol. Rev.*, 54(1): 160.
- Balic, I.M., Milinkovic-Tur, S., Samardzija, M. and Vince, S. (2012) Effect of age and environmental factors on semen quality, glutathione peroxidase activity and oxidative parameters in Simmental bulls. *Theriogenology*, 78(2): 423-431.
- Basirico, L., Bernabucci, U., Morera, P., Lacetera, N. and Nardone, A. (2009) Gene expression and protein secretion of apolipoprotein B100 (ApoB100) in transition dairy cows under hot or thermoneutral environments. *Ital. J. Anim. Sci.*, 8(2): 592-594.
- Baumgard, L.H. and Rhoads, R.P. (2013) Effects of heat stress on postabsorptive metabolism and energetics. *Annu. Rev. Anim. Biosci.*, 1: 311-337.
- Beede, D.K., Collier, R.J., Wilcox, C.J., Thatcher, W.W., 1985. Effects of warm climates on milk yield and composition (short-term effects). In: Smith, A.J. (Ed.), *Milk Production in Developing Countries*. University of Edinburgh, Scotland, pp. 322–347.
- Benjamin, M.M. (1978) Fluid and electrolytes. In: *Outline of Veterinary Clinical Pathology*. Iowa State Univ. Press, Ames. p213.
- Berg Jeremy M., Tymoczko John L., Stryer Lubert (2012). *Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης*.
- Berman, A.J. (2005) Estimates of heat stress relief needs for Holstein dairy cows. *J. Anim. Sci.*, 83(6): 1377-1384.

- Bernabucci, U., Lacetera, N., Baumgard, L.H., Rhoads, R.P., Ronchi, B. and Nardone, A. (2010) Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domesticated ruminants. *J. Anim. Sci.*, 4(7): 1167-1183.
- Bernatchez, L., Glémet, H., Wilson, C. C., & Danzmann, R. G. (1995). Introgression and fixation of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) mitochondrial genome in an allopatric population of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52(1), 179–185.
- Bhakat, M., Mohanty, T.K., Gupta, A.K. and Abdullah, M. (2014) Effect of season on semen quality of crossbred (Karan Fries) bulls. *Adv. Anim. Vet. Sci.*, 2(11): 632-637.
- Bilby, T.R., Baumgard, L.H., Collier, R.J., Zimbelman, R.B. and Rhoads, M.L. (2008) Heat stress effects on fertility: Consequences and possible solutions. In: *The Proceedings of the 2008 South Western Nutritional Conference*.
- Bitman, J.A., Lefcourt, D.L., Stroud, B., 1984. Circadian and,ultradian temperature rhythms of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 67 (5), 1014–1023.
- Bouraoui, R., Lahmar, M., Majdoub, A., Djemali, M. and Belyea, R. (2002) The relationship of temperature-humidity index with milk production of dairy cows in a Mediterranean climate. *Anim. Res.*, 51(6): 479-491.
- Brand, M. D. et al. (1999) The significance and mechanism of mitochondrial proton conductance. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 23 (Suppl. 6), S4–S11.
- Brand, M. D. (2000). Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Experimental Gerontology*, 35(6–7), 811–820.
- Brosh, A., Chosniak, I., Tadmor, A., Shkolnik, A., 1988. Physiochemical conditions in the rumen of Bedouin goats: effect of drinking, food quality and feeding time. *J. Agric. Sci. (Camb.)* 111, 147–157.
- Cardozo, J., Fernández-Juan, M., Forcada, F., Abecia, A., Muñio-Blanco, T. and Cebrián-Pérez, J.A. (2006) Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Theriogenology*, 66(4): 841-850.
- Chan, E.K.F., Nagaraj, S.H. and Reverter, A. 2010. The evolution of tropical adaptation: comparing Taurine and Zebu cattle. *Animal Genetics* 10: 1365-2052.
- Charlesworth, B., M. T. Morgan, and D. Charlesworth. 1993. The effect of deleterious mutations on neutral molecular variation. *Genetics*. 134: 1289-1303.
- Chebel, R.C., Santos, J.E.P., Reynolds, J.P., Cerri, R.L.A., Juchem, S.O. and Overton, M. (2004) Factor affecting conception rate after artificial insemination and pregnancy loss in lactating dairy cows. *Anim. Rep. Sci.*, 84(3-4): 239-255.
- Cheviron, Z. A., & Brumfield, R. T. (2012). Genomic insights into adaptation to high-altitude environments. *Heredity*, 108(4), 354–361.
- Collier, R.J., Collier, J.L., Rhoads, R.P. and Baumgard, L.H. (2008) Invited review: Genes involved in the bovine heat stress response. *J. Dairy Sci.*, 91(2): 445-454.
- Collier RJ, Stiening CM, Pollard BC, VanBaale MJ, Baumgard LH, Gentry PC, Coussens PM (2006) Use of gene expression microarrays for evaluating environmental stress tolerance at the cellular level in cattle. *J Anim Sci* 84:E1–E13.

- da Fonseca, R. R., Johnson, W. E., O'Brien, S. J., Ramos, M., & Antunes, A. (2008). The adaptive evolution of the mammalian mitochondrial genome. *BMC Genomics*, 9(1), 119.
- Das, J. (2006). The role of mitochondrial respiration in physiological and evolutionary adaptation. *BioEssays*, 28(9), 890–901.
- Das, R., Gupta, I.D., Verma, A., Singh, A., Chaudhari, M.V., Sailo, L., Upadhyay, R.C. and Goswami, J. (2015) Genetic polymorphisms of ATP1A1 gene and their association with heat tolerance in Jersey crossbred cows. *Indian J. Dairy Sci.*, 68(1): 50-54.
- Das, R., Sailo, L., Verma, N., Bharti, P., Saikia, J., Imtiwati, & Kumar, R. (2016). Impact of heat stress on health and performance of dairy animals: A review. *Veterinary World*, 9(3), 260–268.
- Demetrio, D.G.B., Santos, R.M., Demetrio, C.G.B. and Vasconcelos, J.L.M. (2007) Factors affecting conception rates following artificial insemination or embryo transfer in lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, 90(11): 5073-5082.
- Do Amaral, B.C., Connor, E.E., Tao, S., Hayen, M.J., Bubolz, J.W. and Dahl, G.E. (2011) Heat stress abatement during the dry period influences metabolic gene expression and improves immune status in the transition period of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 94(1): 86-96.
- Dowling, D. K., Friberg, U., & Lindell, J. (2008). Evolutionary implications of non-neutral mitochondrial genetic variation. *Trends in Ecology & Evolution*, 23(10), 546–554.
- Edwards, J.L. and Hansen, P.J. (1996) Elevated temperature increases heat shock protein 70 synthesis in bovine two-cell embryos and compromises function of maturing oocytes. *Biol. Reprod.*, 55(2): 340-346.
- Fangue, N. A., Richards, J. G., & Schulte, P. M. (2009). Do mitochondrial properties explain intraspecific variation in thermal tolerance? *Journal of Experimental Biology*, 212(4), 514– 522.
- Fear, J.M. and Hansen, P.J. (2011) Developmental changes in expression of genes involved in regulation of apoptosis in the bovine preimplantation embryo. *Biol. Reprod.*, 84(1): 43-51.
- Feder ME, Hofmann GE (1999) Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol* 61:243–282.
- Fleshner, M. and Johnson, J.D. 2005. Endogenous extracellular heat shock protein 72: Releasing signal(s) and function. *International Journal of Hyperthermia* 21: 457-471.
- Fuquay, J.W., 1981. Heat stress as it affects animal production. *J. Anim. Sci.* 32, 164–174.
- Gendelman, M., and Roth, Z. (2012a) Seasonal effect on germinal vesicle-stage bovine oocytes is further expressed by alterations in transcript levels in the developing embryos associated with reduced developmental competence. *Biol. Reprod.*, 86(1): 1-9.
- Gendelman, M. and Roth, Z. (2012b) In vivo vs. In vitro models for studying the effects

- of elevated temperature on the GV-stage oocyte, subsequent developmental competence and gene expression. *Anim. Reprod. Sci.*, 134(3-4): 125-134.
- Habeeb, A.A.M. (1987) The role of insulin in improving productivity of heat stressed farm animals with different techniques. Ph.D. Thesis, Faculty of Agriculture, Zagazig University, Zagazig, Egypt.
- Hall, M.B. (2009) Heat stress alters ruminal fermentation and digesta characteristics, and behavior in lactating dairy cattle. In: Chilliard, Y., Glasser, F., Faulconnier, Y., Bocquier, F., Veissier, I. and Doreau, M., editors. *Proceeding of 11th International Symposium on Ruminant Physiology*. Wageningen Academic Publication, Wageningen, The Netherlands. p204.
- Hamzaoui, S., Salama, A.A.K., Caja, G., Albanell, E., Flores, C. and Such, X. (2012) Milk production losses in early lactating dairy goats under heat stress. *J. Dairy Sci.*, 95(2): 672-673.
- Hayes, B., Bowman, P., Chamberlain, A. and Goddard, M. 2009. A validated genome-wide association study to breed cattle adapted to an environment altered by climatic change. *PLoS One* 4: 6676.
- Hein, K.G. and Allrich, R.D. (1992) Influence of exogenous adrenocorticotrophic hormone on estrous behavior in cattle. *J. Anim. Sci.*, 70(1): 243-247.
- Helal, A., Hashem, A.L.S., Abdel-Fattah, M.S. and El-Shaer, H.M. (2010) Effect of heat stress on coat characteristics and physiological responses of Balady and Damascus goats in Sinai, Egypt. *Am. Euresian J. Agric. Environ. Sci.*, 7(1): 60-69.
- Hooda, O.K. and Singh, S. (2010) Effect of thermal stress on feed intake, plasma enzymes and blood bio-chemicals in buffalo heifers. *Indian J. Anim. Nutr.*, 27(2): 122-127.
- Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). (2007) *Climate Change: Synthesis Report*. Available from: [http:// www.ipcc.ch/pdf/assessment report/ar4/syr/ar4_syr_sym.pdt](http://www.ipcc.ch/pdf/assessment_report/ar4/syr/ar4_syr_sym.pdt).
- Ju X, Xu H, Yong Y, An L, Jiao P, Liao M (2014). Heat stress upregulation of Toll-like receptors 2/4 and acute inflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cell (PBMC) of Bama miniature pigs: an in vivo and in vitro study. *Animal* 8:1462.
- Kadenbach, B. et al. (1998) Regulation of energy transduction and electron transfer in cytochrome c oxidase by adenine nucleotides. *J. Bioenerg. Biomembr.* 30, 25–33.
- Kadokawa, H., Sakatani, M. and Hansen, P.J. (2012) Perspectives on improvement of reproduction in cattle during heat stress in a future Japan. *Anim. Sci. J.*, 83(6): 439-445.
- Kadzere C.T., Murphy M.R., Silanikove N., Maltz E. (2002). Heat stress in lactating dairy cows: a review. *Livestock Production Science* 77, 59–91.
- Kakavas V. Konstantinos, Plageras Panagiotis E., Vlachos T. Antonios Papaioannou, Agelos Noulas, V. Argiris, (2008). PCR–SSCP: A Method for the Molecular Analysis of Genetic Diseases, *Mol Biotechnol*.
- Kansas, G.S. (1996) Selectins and their ligands: Current concepts and controversies. *Blood*, 88(9): 3259-87.

- Kerr, K. C. R. (2011). Searching for evidence of selection in avian DNA barcodes. *Molecular Ecology Resources*, 11(6), 1045–1055.
- Khodaei-Motlagh, M.M., Zare, Shahneh, A., Masoumi, R. and Fabio, D. (2011) Alterations in reproductive hormones during heat stress in dairy cattle. *Afr. J. Biotechnol.*, 10(29): 5552-5558.
- Kregel KC (2002) Invited review: heatshock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol* 92:2177–2186.
- Lacetera, N., Bernabucci, U., Ronchi, B. and Nardone, A. (1996) Body condition score, metabolic status and milk production of early lactating dairy cows exposed to warm environment. *Riv. Agric. Subtrop. Trop.*, 90(1): 43-55.
- Lallawmkimi, M.C., Singh, S.V., Upadhyay, R.C. and De, S. (2013) Impact of vitamin supplementation on heat shock protein 72 and antioxidant enzymes in different stages of Murrah buffaloes during seasonal stress. *Indian J. Anim. Sci.*, 83(9): 909-915.
- Ledger, H.P., 1959. A possible explanation for part of the heat tolerance exhibited by *Bos taurus* and *Bos indicus* beef cattle. *Nature (Lond.)* 184, 405.
- Lee WC, Wen HC, Chang CP, Chen MY, Lin M-T (2006) Heat shock protein 72 overexpression protects against hyperthermia, circulatory shock, and cerebral ischemia during heatstroke. *J Appl Physiol* 100: 2073–2082.
- Levin, L., Blumberg, A., Barshad, G., & Mishmar, D. (2014). Mito-nuclear co-evolution: the positive and negative sides of functional ancient mutations. *Frontiers in Genetics*, 5, 448.
- Linn, J., Reath-Knight, M. and Larson, R. (2004) Managing heat stressed lactating dairy cows. *Hubbard Feeds Inc.*, 26: 9-10.
- Li Q, Han J, Du F, Ju Z, Huang J, Wang J, Li R, Wang C, Zhong J (2011). Novel SNPs in HSP70A1A gene and the association of polymorphisms with thermotolerance traits and tissue specific expression in Chinese Holstein cattle. *Mol Biol Rep* 38:2657–2663.
- Liu Y, Li D, Li H, Zhou X, Wang G (2011). A novel SNP of the ATP1A1 gene is associated with heat tolerance traits in dairy cows. *Mol Biol Rep* 38:83–88.
- Leray M., Yang J., Meyer C., Mills S., Agudelo N., Ranwez V., Boehm J. and Machida R. (2013). A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents. *Frontiers in Zoology*.
- Lowell, B. B., & Spiegelman, B. M. (2000). Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature*, 404(6778), 652–660.
- Maltz, E., Olsson, K., Glick, S.M., Fyhrquist, F., Silanikove, N., Chosniak, I., Shkolnik, A., 1984. Homeostatic response to water deprivation or hemorrhage in lactating and non lactating Bedouin goats. *Comp. Biochem. Physiol.* 77A, 79–84.
- Maria S. Jimenez Jose M. Luque-Alled Teresa Gomez Juan R. Castillo, (2016). Evaluation of agarose gel electrophoresis for characterization of silver nanoparticles in industrial products, *Electrophoresis*.
- Mariasegaram, R., Chase, C.C., Jr Chaparro, J.X., Olson, T.A., Brenneman, R.A. and

- Niedz, R.P. (2007) The slick air coat locus maps to chromosome 20 in Senepol-derived cattle. *Anim. Genet.*, 38: 54-59.
- Maurya, V.P., Naqvi, S.M.K., Joshi, A. and Mittal, J.P. 2007. Effect of high temperature stress on physiological responses of Malpura sheep. *Indian Journal of Animal Sciences* 77: 1244-1247.
- McDowell, L.R., editor. (1989) *Vitamins in Animal Nutrition: Comparative Aspects to Human Nutrition*. Academic Press, London. p10-52, 93-131.
- Melo-Ferreira, J., Boursot, P., Suchentrunk, F., Ferand, N., & Alves, P. C. (2005). Invasion from the cold past: extensive introgression of mountain hare (*Lepus timidus*) mitochondrial DNA into three other hare species in northern Iberia. *Molecular Ecology*, 14(8), 2459–2464.
- Mishmar, D., Ruiz-Pesini, E., Golik, P., Macaulay, V., Clark, A. G., Hosseini, S., Wallace, D. C. (2003). Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(1), 171–176.
- Mishra, S.R., Kundu, A.K. and Mahapatra, A.P.K. (2013) Effect of ambient temperature on membrane integrity of spermatozoa in different breeds of bulls. *The Bioscan*, 8(1): 181-183.
- Morales, H. E., Pavlova, A., Joseph, L., & Sunnucks, P. (2015). Positive and purifying selection in mitochondrial genomes of a bird with mitonuclear discordance. *Molecular Ecology*, 24(11), 2820–2837.
- Mullick, D.N., 1960. Effect of humidity and exposure to sun on the pulse rate, respiration rate, rectal temperature and haemoglobin level in different sexes of cattle and buffalo. *J. Agric. Sci.* 54, 391–402.
- Nardone, A., Ronchi, B., Lacetera, N. and Bernabucci, U. 2006. Climatic effects on productive traits in livestock. *Veterinary Research Communications* 30: 75-81.
- Nardone, A., Ronchi, B., Lacetera, N., Ranieri, M.S. and Bernabucci, U. (2010) Effect of climate changes on animal production and sustainability of livestock systems. *Livest. Sci.*, 130(1-3): 57-69.
- Nonaka, I., Takusari, N., Tajima, K., Suzuki, T., Higuchi, K. and Kurihara, M. (2008) Effects of high environmental temperatures on physiological and nutritional status of prepubertal Holstein heifers. *Livest. Sci.*, 113(1): 14-23.
- NRC. (2007) *Nutrient Requirements of Small Ruminants, Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids*. National Academy Press, Washington, DC.
- Page TJ, Sikder D, Yang L, Pluta L, Wolfinger RD, Kodadek T, Thomas RS (2006) Genome-wide analysis of human HSF1 signaling reveals a transcriptional program linked to cellular adaptation and survival. *Mol Biosyst* 2:627–639.
- Pesole, G., Gissi, C., De Chirico, A., & Saccone, C. (1999). Nucleotide Substitution Rate of Mammalian Mitochondrial Genomes. *Journal of Molecular Evolution*, 48(4), 427–434.
- Pirkkala L, Nykänen P, Sistonen LEA (2001) Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. 15:1118–1131.
- Pörtner, H. O. (2001). Climate change and temperature-dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals. *Naturwissenschaften* 88,

137146.

- Pörtner, H.-O., Hardewig, I., Sartoris, F.-J., & van Dijk, P. (1998). Energetic aspects of cold adaptation critical temperatures in metabolic, ionic and acid-base regulation? EPIC3Cold Ocean Physiology (H O Pörtner, R Playle, Eds) Cambridge University Press, Pp. 88-120.
- Pörtner, H. O. (2002). Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comp. Biochem. Physiol.* 132, 739-761.
- Pörtner, H. O., Mark, F. C. and Bock, C. (2004). Oxygen limited thermal tolerance in fish? Answers obtained by nuclear magnetic resonance techniques. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 141, 243-260.
- Pörtner, H. O., Peck, L. and Somero, G. N. (2007). Thermal limits and adaptation in marine Antarctic ectotherms: an integrative view. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B, Biol. Sci.* 362, 2233-2258.
- Privolo, G. and Riva, E. (2009) One year study of lying and standing behaviour of dairy cows in a freestall barn in Italy. *J. Agric. Eng.*, 2: 27-33.
- Rahman, M.B., Kamal, M.M., Rijsselaere, T., Vandaele, L., Shamsuddin, M. and Soom, A.V. (2013) Altered chromatin condensation of heat stressed spermatozoa perturbs the dynamics of DNA methylation reprogramming in the paternal genome after in vitro fertilisation in cattle. *Reprod. Fertil. Dev.*, 26(8): 1107-1116.
- Rhoads, M.L., Rhoads, R.P., Baale, M.J., Collier, R.J., Sanders, S.R., Weber, W.J., Croocker, B.A. and Baumgard, L.H. (2009) Effects of heat stress and plane of nutrition on lactating Holstein cows: I. Production, metabolism, and aspects of circulating somatotropin. *J. Dairy Sci.*, 92(5): 1986-1997.
- Rhoads, R.P., Baumgard, L.H., Suagee, J.K. and Sanders, S.R. (2013) Nutritional interventions to alleviate the negative consequences of heat stress. *Adv. Nutr.*, 4(3): 267-276.
- Rolfe, D. F. & Brown, G. C. (1997) Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol. Rev.* 77, 731–758.
- Roth, Z., Meidan, R., Braw-Tal, R. and Wolfenson, D. (2000) Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows. *J. Reprod. Infertil.*, 120(1): 83-90.
- Rutledge, J.J. (2001) Use of embryo transfer and IVF to bypass effects of heat stress. *Theriogenology*, 55(1): 105-111.
- Sakatani M, Balboula AZ, Yamanaka K, Takahashi M (2012) Effect of summer heat environment on body temperature, estrous cycles and blood antioxidant levels in Japanese Black cow. *Anim Sci* 83:394– 402.
- Sanders, A.H., Shearer, J.K. and De Vries, A. (2009) Seasonal incidence of lameness and risk factors associated with thin soles, white line disease, ulcers, and sole punctures in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 92(7): 3165-3174.
- Sarge, K.D., Murphy, S.P. and Morimoto, R.I. 1993. Activation of heat shock gene transcription by heat shock factor 1 involves oligomerization, acquisition of DNA-binding activity, and nuclear localization and can occur in the absence of stress. *Molecular and Cellular Biology* 13: 1392-1407.

- Savolainen V., Cowan R.S., Vogler A.P., Roderick G.K. and Lane R. 2005. Towards writing the encyclopaedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 360:1805-1811.
- Schneider, P.L., Beede, D.K., Wilcox, C.J. and Collier, R.J. (1984) Influence of dietary sodium and potassium bicarbonate and total potassium on heat-stressed lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 67(11): 2546-2553.
- Scott, G. R. (2015). Early insights into the evolution of respiratory and cardiovascular physiology in vertebrates. *Journal of Experimental Biology*, 218(18), 2818–2820.
- Scott, G. R., Schulte, P. M., Egginton, S., Scott, A. L. M., Richards, J. G., & Milsom, W. K. (2011). Molecular Evolution of Cytochrome c Oxidase Underlies High-Altitude Adaptation in the Bar-Headed Goose. *Molecular Biology and Evolution*, 28(1), 351–363.
- Sejian V. (2013) Climate Change: Impact on production and reproduction, adaptations mechanisms and mitigation strategies in small ruminants: a review. *The Indian Journal of Small Ruminants*, 19(1): 1-21.
- Sejian, V., Indu, S. and Naqvi, S.M.K. (2013) Impact of short term exposure to different environmental temperature on the blood biochemical and endocrine responses of Malpura ewes under semi-arid tropical environment. *Indian J. Anim. Sci.*, 83(11): 1155-1160.
- Shalit, O., Maltz, E., Silanikove, N., Berman, A., 1991. Water, Na, K, and Cl metabolism of dairy cows at onset of lactation in hot weather. *J. Dairy Sci.* 74, 1874–1883.
- Sharma, A.K., Rodriguez, L.A., Mekonnen, G., Wilcox, C.J., Bachman, K.C., Collier, R.J., 1983. Climatological and genetic effects on milk composition and yield. *J. Dairy Sci.* 66, 119–126.
- Silanikove, N. and Koluman, N.D. (2015) Impact of climate change on the dairy industry in temperate zones: Predications on the overall negative impact and on the positive role of dairy goats in adaptation to earth warming. *Small Rumin. Res.*, 123: 27-34.
- Singhal, S.P., Dhanda, O.P. and Razdan, M.N. (1984) Some managemental and therapeutic approaches in the treatment of physiological infertility of water buffaloes (*Bubalus bubalis*). In: *Proceedings of 10th International Congress Animal Reproduction and Artificial Insemination*. Vol. 3. p471.
- Singh, M., Chaudhari, B.K., Singh, J.K., Singh, A.K. and Maurya, P.K. (2013) Effects of thermal load on buffalo reproductive performance during summer season. *J. Biol. Sci.*, 1(1): 1-8.
- Somero, G. N. (2002). Thermal Physiology and Vertical Zonation of Intertidal Animals: Optima, Limits, and Costs of Living. *Integrative and Comparative Biology*, 42(4), 780–789.
- Soriani, N., Panella, G. and Calamari, L. (2013) Rumination time during the summer season and its relationships with metabolic conditions and milk production. *J. Dairy Sci.*, 96(8): 5082-5094.
- Srikandakumar A. and Johnson, E.H. (2004) Effect of heat stress on milk production, rectal temperature, respiratory rate and blood chemistry in Holstein, Jersey and

- Australian Milking Zebu cows. *Trop. Anim. Health Prod.*, 36(7): 685-692.
- Srikanth, K., Kwon, A., Lee, E., & Chung, H. (2016). Characterization of genes and pathways that respond to heat stress in Holstein calves through transcriptome analysis. *Cell Stress and Chaperones*, 22(1), 29–42.
- Stella, A.V., Paratte, R., Valnegri, L., Cigalino, G., Soncini, G., Chevaux, E., Dell’Orto, V. and Savoini, G. (2007) Effect of administration of live *Saccharomyces cerevisiae* on milk production, milk composition, blood metabolites, and faecal flora in early lactating dairy goats. *Small Rumin. Res.*, 67: 7-13.
- Stier, A., Bize, P., Habol, C., Bouillaud, F., Massemin, S., & Criscuolo, F. (2014). Mitochondrial uncoupling prevents cold-induced oxidative stress: a case study using UCP1 knockout mice. *The Journal of Experimental Biology*, 217(Pt 4), 624–630.
- Stier, A., Bize, P., Roussel, D., Schull, Q., Massemin, S., & Criscuolo, F. (2014). Mitochondrial uncoupling as a regulator of life-history trajectories in birds: an experimental study in the zebra finch. *Journal of Experimental Biology*, 217(19), 3579–3589.
- Strong R, Silva E, Cheng H, Eicher S (2015) Acute brief heat stress in late gestation alters neonatal calf innate immune functions. *J Dairy Sci* 98:7771–7783.
- Sunil Kumar, B.V., Kumar, A. and Kataria, M. (2011) Effect of heat stress in tropical livestock and different strategies for its amelioration. *J. Stress Physiol. Biochem.*, 7(1): 45-54.
- Sunil Kumar, B.V., Singh, G. and Meur, S.K. (2010) Effects of Addition of electrolyte and ascorbic acid in feed during heat stress in buffaloes. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 23(7): 880-888.
- Tao, S. and Dahl, G.E. (2013) Heat stress effects during late gestation on dry cows and their calves. *J. Dairy Sci.*, 96(7): 4079-4093.
- Thornton, P., van de Steeg, J., Notenbaert, M.H. and Herrero, M. (2009) The impacts of climate change on livestock and livestock systems in developing countries: A review of what we know and what we need to know. *Agric. Syst.*, 101(3): 113-127.
- Tytell, M. 2005. Release of heat shock proteins (HSPs) and the effects of extracellular HSPs on neural cells and tissues. *International Journal of Hyperthermia* 21: 445-455.
- Vale, W.G. (2007) Effects of environment on buffalo reproduction. *Ital. J. Anim. Sci.*, 6(2): 130-142.
- Vitali, A., Segnalini, M., Bertocchi, L., Bernabucci, U., Nardone, A. and Lacetera, N. (2009) Seasonal pattern of mortality and relationships between mortality and temperature humidity index in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 92(8): 3781-3790.
- Voellmy, R. and Boellmann, F. 2007. Chaperone regulation of the heat shock protein response. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 594: 89-99.
- Wallace, D. C. (2005). Mitochondria and cancer: Warburg addressed. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 70, 363–374.
- Wallace, D. C. (2010). Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 51(5), n/a-n/a.

- Wallace, D. C. (2013). A mitochondrial bioenergetic etiology of disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(4), 1405–1412.
- Wang, Z., Wang, G., Huang, J., Li, Q., Wang, C. and Zhong, J. (2011) Novel SNPs in the ATP1B2 gene and their associations with milk yield, milk composition and heat-resistance traits in Chinese Holstein cows. *Mol. Biol. Rep.*, 38: 1749-1755.
- West, J.W. (2003) Effects of heat-stress on production in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 86(6): 2131-2144.
- West, J.W. (1999) Nutritional strategies for managing the heat stressed dairy cows. *J. Anim. Sci.*, 77(2): 21-35.
- Wheelock, J.B., Rhoads, R.P., Van Baale, M.J., Sanders, S.R. and Baumgard, L.H. (2010) Effect of heat stress on energetic metabolism in lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, 93(2): 644-655.
- White, C., Alton, L. (2012). Metabolic cold adaptation in fishes occurs at the level of whole animal, mitochondria and enzyme.
- Wilson, D.E., Reeder, D.M., eds. (2005). "Bos taurus". *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference* (3rd ed.). Johns Hopkins University Press.
- Wolfenson, D., Roth, Z. and Meidan, R. (2000) Impaired reproduction in heat stressed cattle aspects. *Anim. Rep. Sci.*, 60-61: 535-547.
- Wolfenson, D. (2009) Impact of heat stress on production and fertility of dairy cattle. In: *Proceedings of the 18th Annual Tri-State Dairy Nutrition Conference*. Fort Wayne, IN, USA. 21-22 April 2009. p55-59.
- Yattoo, M.I., Dimri, M. and Sharma, M.C. (2014) Seasonal changes in certain blood antioxidants in cattle and buffaloes. *Indian J. Anim. Sci.*, 84(2): 173-176.
- Yousef, M.K. (1985) *Stress Physiology in Livestock*. Vol. 1. CRC Press, Boca Raton. p67-73.
- Zheng, L., Chenh, M., and Zhi-Cheng, G. (2009) Effects of heat stress on milk performance and fatty acids in milk fat of Holstein dairy cows. *J. Chin. Dairy Ind.*, 37(9): 17-19.
- [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh?term=Polymerase%20chain%20reaction%20\(PC](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh?term=Polymerase%20chain%20reaction%20(PCR))
R) (Polymerase Chain Reaction, MeSH, 1991)